

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



**“EVALUACIÓN DEL EXAMEN HEMATOLÓGICO Y LA
TÉCNICA INDIRECTA DE ELISA EN EL DIAGNÓSTICO
CLÍNICO-LABORATORIAL DE EHRlichiosis CANINA”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

LUIS ANTONIO HOYOS SIFUENTES
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA

LIMA-PERÚ

2005

*A Dios, Jesús y la virgencita porque así se cambie de ropa
y de nombre siempre será muy linda y cuidará de nosotros
.... soy un Maristas ... y del Callao*

*A mis padres, Luis Antonio y Juana Victoria, gracias
por poner luces al camino....cuando éstas se quieren apagar.
Gracias viejito por ser siempre mi modelo profesional a seguir...
Gracias viejita, por ser esa mezcla de inocencia y buen humor puro corazón !!!
Gracias a los dos por enseñarme lo más importante de la vida
..... Dar sin esperar recibir nada a cambio.*

*A mi hermano Richón, que desde chico me enseñó mucho sin notarlo quizá
Gracias por hacer que me guste la música de Soda Stereo, Enanitos Verdes,
Eros Ramazotti y todas las películas de Rocky... Que chévere los 80..!!
Y gracias por traer con nosotros a ese angelito.... tu hija Arianita*

*A la Dra. Olga Li, gracias, gracias, gracias....mil gracias por todo
Desde que llegué, Ud. me enseñó a trabajar y me dio siempre la confianza
para avanzar y aprender sin miedo.
Siempre tuvo para conmigo algo que esta un poco escaso por
estas épocas....honestidad y Desprendimiento..... gracias Doctora.*

*A mi familia del Laboratorio por el respaldo en todo momento y la confianza.
Gracias Mamá Blanquita y Papucho por tantos momentos que hemos compartido,
por el apoyo cuando lo necesitaba y por escucharme cuando quería hablar.
Gracias Dr. Alvarado por su amistad y apoyo en el Laboratorio.
Gracias a todos por dejarme entrar y ser parte de una familia que no quisiera perder.*

*A mis hermanos y colegas.... mejor dicho los Megaquistes....!!!
Gracias Peloncito, Motita, Chapita y Chelito. Por formar algo que
el tiempo nunca modificará nuestra amistad.
Gracias por los innumerables momentos que compartimos juntos.*

*A las chicas que son como esas hermanitas que nunca tuve.... mejor!
Gracias a la Natty y a la Chanita por decir las cosas como son.
Y en especial a la Verito por apoyarme siempre y enseñarme que uno debe ser como és.*

*A Consuelo Guadalupe Sánchez Vivanco más conocida como Conchito
Gracias mujer por ser la persona que con sus exigencias, hiciera que
diera mi mayor esfuerzo para salir adelante en lo profesional y en lo personal.
Así nuestros caminos sean distintos te agradeceré siempre.....*

*A esa persona que representa mucho desde que era muy niño....
Gracias Patrick por ser el amigo que se convirtió en más que eso no piensen mal
Gracias por no olvidar nunca que lo más importante de ser patas
..... Es nunca jugar en el equipo contrario..... jajajaja !!*

*A la mamá María tienes un corazón tan grande.... pero tan grande.
Gracias mamita por ser tan linda, por tener siempre un saludo afectuoso
y un abrazo desinteresado que hace que uno extrañe tomar un cafecito
o comerse un cubanita con dos huevos en el Moscú.*

*Gracias a la negrita de mi corazón gracias Gianina, por ser amiga.
Siempre te voy a estar agradecido por ser tu misma conmigo, así no
hayas aceptado que te invitara al cine tu te la pierdes ! ... jajaja !*

*A la gentita de "Bendita" Pedro, Mario, Gustavo, Juanca, Omar y Manuel
Por todos esos momentos compartidos detrás de una pelota que hizo que nos
conociéramos y que se formara un grupo de amigos que siempre será Bendita !*

*A la gente linda de "Kollpa" ... que con el pretexto de hacer música
formábamos algo más importante amigos para todo.
Gracias Juancito, Nolo, Armando, Kike, Edgar, Erick, Charlie y Miguel
por tocar juntos y estoy seguro que seguiremos haciéndolo.....*

*Que sería de la vida de uno si no tuviese ilusiones aburrida no?
Gracias porque después que conocerte todo cambió todo.
Gracias por hacer que siempre recuerde que existe un Patch Adams en el mundo ...
y por creer que "cementos Pacasmayo" era un lugar en plena Panamericana Norte que burro!!*

CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FOTOGRAFÍAS	xi
LISTA DE APÉNDICES	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Ehrlichiosis canina : Historia y distribución geográfica actual.	4
2.2. Enfermedades ehrlichiales en caninos.	7
2.2.1. Ehrlichiosis monocítica canina (EMC)	7
2.2.2. Ehrlichiosis trombocítica canina (ETC)	9
2.2.3. Ehrlichiosis granulocítica canina (EGC)	10
2.3. Características del agente patógeno.	11
2.3.1. Generalidades de los agentes rickettsiales.	11
2.3.2. Propiedades del género <i>Ehrlichia spp.</i>	13
2.3.3. Reclasificación del ORDEN <i>Rickettsiales</i> .	16

2.4.	Patogénesis de la ehrlichiosis canina por <i>Ehrlichia canis</i>	21
2.4.1.	Ingreso del agente y la fase aguda	21
2.4.2.	Fase subclínica o silenciosa	25
2.4.3.	Fase final o crónica	26
2.5.	Respuesta inmune a la enfermedad	27
2.5.1.	Respuesta inmune contra microorganismos intracelulares	27
2.5.2.	Respuesta inmune en fase aguda	29
2.5.3.	Respuesta inmune en fase subclínica	34
2.5.4.	Vulnerabilidad inmune ligada a la cronicidad	35
2.6.	Diagnóstico de la enfermedad	36
2.6.1.	Diagnóstico clínico	36
2.6.1.1.	Signos clínicos en fase aguda	36
2.6.1.2.	Signos clínicos en fase subclínica	38
2.6.1.3.	Signos clínicos en fase crónica	39
2.6.2.	Diagnóstico laboratorial	41
2.6.2.1.	Examen hematológico	41
2.6.2.2.	Bioquímica sanguínea	43
2.6.2.3.	Análisis de orina	44
2.6.2.4.	Pruebas serológicas	44
2.6.2.4.1.	Inmunofluorescencia indirecta (IFA)	45
2.6.2.4.2.	Inmunoelectrotransferencia (EITB)	46
2.6.2.4.3.	Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)	46
2.6.3.	Diagnóstico histopatológico	50
2.6.4.	Diagnóstico molecular	52
2.7.	Inmunización	54
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1.	Lugar y época de ejecución del estudio	57
3.2.	Materiales	57
3.2.1.	Animales	57
3.2.2.	Materiales	58

3.3.	Métodos	59
3.3.1.	Obtención de información del paciente	59
3.3.2.	Toma de muestra	60
3.3.3.	Examen hematológico	61
3.3.3.1.	Determinación del hematocrito (<i>Ht</i>)	61
3.3.3.2.	Recuento de glóbulos blancos y rojos	61
3.3.3.3.	Determinación de hemoglobina (<i>Hb</i>)	62
3.3.3.4.	Recuento Diferencial	63
3.3.4.	Prueba serológica	65
3.4.	Análisis de Datos	66
IV.	RESULTADOS	68
V.	DISCUSIÓN	76
VI.	CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES	82
VII.	BIBLIOGRAFÍA	84
VIII.	APÉNDICE	99

LISTA DE CUADROS

CUADRO N° 1.

Respuesta humoral (IgG2) contra *Ehrlichia canis*. 48

CUADRO N° 2.

Análisis estadístico e *I.C.* del sexo, edad, raza, trombocitopenia, leucopenia, anemia y antecedente de garrapatas en los 77 casos seropositivos a *Ehrlichia canis* (2002 – 2004) 70

CUADRO N° 3.

Análisis estadístico e *I.C.* de las razas Pastor Alemán y Nórdicas (Siberian-Husky y Samoyedo) frente a las demás razas respecto a los signos hemorrágicos en los casos seropositivos a *Ehrlichia canis* (2002 – 2004). 71

CUADRO N° 4.

Frecuencias e *I.C.* de las citopenias encontradas en los 77 casos compatibles con ehrlichiosis canina frente a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* (2002 – 2004). 72

CUADRO N° 5.

Frecuencias e *I.C.* de signos clínicos encontrados en los 77 casos compatibles con ehrlichiosis canina frente a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* (2002 – 2004). 73

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1.

Microestructura de las “mórulas” de *Ehrlichia chaffeensis*
dentro de la célula hospedero. 15

FOTOGRAFÍA N° 2.

Hemorragias cutáneas puntiformes (petequias) en región
costoabdominal. 40

FOTOGRAFÍA N° 3.

Hemorragias cutáneas (eritema) en región inguinal. 40

FOTOGRAFÍA N° 4.

Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formas densas). 74

FOTOGRAFÍA N° 5.

Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formas densas y ligeras I) 74

FOTOGRAFÍA N° 6.

Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formas densas y ligeras II) 75

FOTOGRAFÍA N° 7.

Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formación morular) 75

LISTA DE APÉNDICES

APÉNDICE N° 1.

Resultados del examen hematológico y ELISA indirecta de los 77 casos con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis canina (2002 – 2004)	99
--	----

APÉNDICE N° 2.

Distribución racial de los 77 casos con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis canina (2002 – 2004).	101
--	-----

APÉNDICE N° 3.

Evidencias de sangrados de los 77 casos con signos clínicos compatibles con ehrlichiosis canina (2002 – 2004).	102
--	-----

APÉNDICE N° 4.

Signos clínicos de los 58 casos seropositivos a ehrlichiosis canina (2002 – 2004).	103
--	-----

APÉNDICE N° 5.

Metodología y lectura de la prueba Snap 3DX (Técnica indirecta de ELISA).	104
---	-----

RESUMEN

La Ehrlichiosis canina es una enfermedad causada por diversos microorganismos rickettsiales, principalmente *Ehrlichia canis*. Está reportada alrededor del mundo como una enfermedad zoonótica y en el Perú fue detectada en 1982. El diagnóstico clínico se basa en la detección de signos, tales como depresión, fiebre, anorexia, mucosas pálidas, pérdida de peso, linfadenopatía, hifema y eritema. En el laboratorio clínico, la hematología, bioquímica sanguínea, uroanálisis y pruebas serológicas son de gran utilidad en el diagnóstico definitivo. En el presente estudio se determinó el grado de concordancia entre el examen hematológico y la técnica indirecta de ELISA, ya que la relación entre ambas pruebas es desconocida en nuestro medio. 97 perros fueron obtenidos provenientes del Laboratorio de Patología Clínica en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se encontró un $84.67 \pm 10.98\%$ de grado de concordancia. Asimismo, se determinó que la trombocitopenia, leucopenia, anemia y el antecedente de garrapatas fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$) en relación a la presencia de la enfermedad. El porcentaje de Ehrlichiosis canina en perros cruzados y de raza Pastor Alemán fue mayor en relación a las demás razas. Los perros de raza nórdica (Siberiano y Samoyedo) presentaron significancia estadística a padecer cuadros hemorrágicos por esta enfermedad. Finalmente, se encontró una concordancia alta entre ambas pruebas, estos resultados evidencian que en nuestro país la hematología es de gran importancia en el diagnóstico de la Ehrlichiosis canina, quedando la serología como prueba de apoyo en casos confusos.

Palabras clave: *Ehrlichia canis*, hematología, trombocitopenia y técnica indirecta de ELISA.

ABSTRACT

Canine Ehrlichiosis is a disease caused by different rickettsial microorganisms, principally by *Ehrlichia canis*. It has been reported around the world like a zoonotic disease and in our country was detected in 1982. The clinic diagnosis is based in detection of signs like depression, fever, anorexia, pallor of mucous membranes, lost of weight, lymphadenopathy, hiphema and erythema. In Clinical Laboratory, the hematology, sanguineous biochemistry, urine-analysis and serologic tests are usefulness in definitive diagnosis. The present study determinated the concordance grade between the hematology test and indirect ELISA assay, because la relationship between both tests is unknown in our country. 97 dogs were obtained from the Clinical Pathology Laboratory in Veterinary Medicine Faculty of San Marcos National University. We are found $84.67 \pm 10.98\%$ of concordance grade. Likewise, was determinated that thrombocytopenia, leukopenia, anemia and tick contact antecedent were significant ($P < 0.05$) in relation with evidence of disease. The percent of cross-breed dogs and German Shepherd dogs (GSDs) with Canine Ehrlichiosis was higher than other breeds. The hemorrhage signs were statistic significance only in Nordic races (Siberian Husky and Samoyedo). Finally, we found a high concordance grade between both tests, this results reveal that hematology in our country is very important in the Canine Ehrlichiosis diagnostic and serology is a support test in confuse cases.

Key Words: *Ehrlichia canis*, hematology, thrombocytopenia and indirect ELISA assay.

I. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de múltiples enfermedades infecciosas a menudo se basa en los datos que brinda la anamnesis, el examen clínico, así como los resultados de las pruebas de laboratorio disponibles. Desde hace varios años se ha incrementado el número de casos de perros con ehrlichiosis canina en diversas áreas geográficas del mundo, clasificándola actualmente como una enfermedad emergente. Esta enfermedad fue identificada en nuestro país en 1982, en perros de raza Pastor Alemán que fueron importados de EE.UU. para la Policía Nacional. (Chavera *et al.*, 1982). Desde ese entonces la enfermedad se presenta con mayor impacto en las épocas de verano debido a su transmisión vectorial.

La ehrlichiosis canina es causada principalmente por la *Ehrlichia canis*, un microorganismo rickettsial transmitido por el *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata parda del perro (Mc Bride *et al.*, 2001). Existen otras especies ehrlichiales que provocan enfermedad en los caninos, pero éstas aún no han sido reportadas en nuestro medio. Clínicamente, la enfermedad presenta un cuadro agudo o inicial, seguida de una etapa subclínica de duración variable donde desaparecen los signos, para finalmente llegar a una etapa crónica caracterizada por cuadros de aplasia medular en casos graves y signos hemorrágicos de intensidades variables.

La fase aguda presenta una sintomatología leve o inaparente caracterizada por depresión, anorexia, fiebre, mucosas pálidas, esplenomegalia, linfadenomegalia y hepatomegalia (Parnell, 2004), pudiendo ser confusa para el clínico con otras enfermedades. La etapa subclínica carece de signos y finalmente la fase crónica presenta manifestaciones clínicas severas, tales como postración, anorexia marcada con pérdida progresiva de peso, palidez marcada, edema en miembros posteriores, poliartropatías, petequias, equimosis y epistaxis (Neer, 2000), así como evidencia de hemorragias internas (hematuria y hematoquecia) y alteraciones nerviosas (meningitis).

En el laboratorio de Patología Clínica de la FMV - UNMSM, desde 1982 se realiza el diagnóstico de esta enfermedad basándose mayormente en los resultados que brinda el examen hematológico, uroanálisis, bioquímica sanguínea y recientemente en el ámbito comercial, la detección serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia canis*, el agente causal más difundido a nivel mundial y en nuestro medio de las enfermedades ehrlichiales en caninos.

Hematológicamente, en la fase aguda se observa trombocitopenia, anemia y leucopenia en intensidades leves o moderadas (Botelho de Castro *et al.*, 2004), pudiendo encontrarse leucocitosis con monocitosis y/o linfocitosis. En la etapa subclínica permanecen las alteraciones, principalmente la trombocitopenia (Ettinger, 1992). Finalmente, alteraciones severas como trombocitopenia, anemia y leucopenia marcada provocadas por aplasia medular, caracterizan la etapa crónica (Harrus *et al.*, 1999). La hiperproteinemia, caracterizada por hiperglobulinemia (beta y gammaglobulinas) y la hipoalbuminemia son las alteraciones bioquímicas más consistentes de la ehrlichiosis canina (Harrus *et al.*, 1997). La proteinuria, hematuria y bilirrubinuria son los hallazgos más frecuentes en el uroanálisis.

Las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de ehrlichiosis a nivel mundial son la inmunofluorescencia indirecta (IFA), inmunoelectrotransferencia (EITB) y la técnica inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA). En nuestro país, se utilizan

actualmente kits comerciales basados en la técnica indirecta de ELISA, que tienen como ventaja la rapidez y facilidad para su realización. Esta prueba serológica se ha convertido en una herramienta de gran utilidad diagnóstica en el laboratorio en diversos países latinoamericanos, tales como Brasil, México, Venezuela y Chile, donde la enfermedad es prevalente (De Moraes *et al.*, 2004; López *et al.*, 1999; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2004).

Recientemente, las técnicas diagnósticas a nivel molecular han revolucionado el mundo del diagnóstico, llegando a conocer los genes involucrados en la expresión de antígenos inmunodominantes de los microorganismos ehrlichiales (Mc Bride *et al.*, 2003), así como, la expresión de estos genes en los hospederos naturales (vertebrados e invertebrados) dentro del ciclo biológico de estas bacterias (Unver *et al.*, 2001a). La inmunización eficiente de los animales es la tarea actual de la mayoría de investigadores, de tal forma que los genes específicos que codifican proteínas de importancia diagnóstica, están siendo utilizados en el laboratorio, insertándolos en microorganismos que a su vez expresan las proteínas en altas cantidades. Estas proteínas recombinantes son la base para la inducción de una inmunización dirigida y específica contra las proteínas que promueven la respuesta inmune en los animales infectados (Felek *et al.*, 2003).

Así entonces, el diagnóstico se centra en las manifestaciones clínicas, alteraciones hematológicas y pruebas diagnósticas (serológicas y moleculares), constituyendo las herramientas para llegar al diagnóstico definitivo. Por lo tanto, la evaluación de las alteraciones hematológicas y de las técnicas serológicas y/o inmunológicas utilizadas en nuestro medio para los casos de ehrlichiosis canina llegados al laboratorio sería de gran utilidad para la interpretación de futuros casos de esta enfermedad.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EHRLICHIOSIS : HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA ACTUAL

La ehrlichiosis canina engloba a diversas enfermedades sistémicas provocadas por múltiples microorganismos del *Orden Rickettsiales*, que poseen características estructurales similares a las bacterias gramnegativas, siendo transmitidos por garrapatas (Parnell., 2004).

La enfermedad se presenta en los países templados, tropicales y subtropicales del mundo, en correspondencia con el rango geográfico del hospedero definitivo, la garrapata vector y el agente rickettsial involucrado. Algunas especies han sido reportadas en áreas específicas en el mundo, por ejemplo en Australia no ha sido documentada la enfermedad hasta la fecha (Ettinger, 1992).

Se conocen los vectores artrópodos y los hospedadores animales domésticos de muchas especies, pero aún no se aclara por completo la información epidemiológica, incluyendo los animales huéspedes, reservorios silvestres o domésticos (Neer, 2000).

El primer agente ehrlichial fue observado en Argelia por Donatien y Lestoquard en 1935, quienes identificaron un microorganismo rickettsial en monocitos de caninos que cursaban con una enfermedad que ocasionaba pancitopenia severa, el cual fue denominado *Rickettsia canis* (Sainz *et al.*, 2000), para luego ser renombrado en 1945 como *Ehrlichia canis* (*E. canis*) en honor al bacteriólogo Paul Ehrlich (López *et al.*, 2003).

Posteriormente, se identificó que en humanos también se producía la infección ehrlichial. En 1955, se produjo en Japón un síndrome aparentemente producido por un agente ehrlichial, conocido como “Fiebre del Sennetsu”, semejante a la mononucleosis. Al agente causal se le asignó posteriormente el nombre científico de *Ehrlichia sennetsu* (actualmente *Neorickettsia sennetsu*) (López *et al.*, 2003; Dumler *et al.*, 2001). Esta enfermedad está presente también en Malasia (Brooks *et al.*, 1999).

En los Estados Unidos fue reconocida por primera vez la *E. canis* en 1962 y a finales de la década de los 60 se definió el rol patogénico significativo de esta especie, cuando se pudo establecer su participación etiológica en la enfermedad llamada “Pancitopenia Tropical Canina” (PTC) (Greene, 1997; Ettinger, 1992). La *E. canis* actualmente es considerada de distribución mundial (Dumler *et al.*, 2001).

En 1978 fue identificada por primera vez en Estados Unidos la *Ehrlichia platys*, actualmente denominada *Anaplasma platys* (*A. platys*) (Dumler *et al.*, 2001) y posteriormente se ha señalado en otros países americanos y europeos (Neer, 2000; Ettinger, 1992; Sainz *et al.*, 2000). Esta especie ha sido identificada además en Japón, Tailandia, Europa, Taiwán, Grecia, Israel y Venezuela (Dumler *et al.*, 2001).

En los EE.UU. se diagnosticó por primera vez la ehrlichiosis monocítica humana (EMH) en 1986, mientras que en 1994 se descubrió la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH). Las especies que ocasionaban estas dos enfermedades eran inéditas, no reportadas anteriormente (Prescott *et al.*, 1999). Sólo en Asia se habían diagnosticado los casos de ehrlichiosis en humanos (López *et al.*, 2003). La EMH es causada por la *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) (Paddock y Childs, 2003) y la EGH es provocada por un agente

similar o idéntico a la *Ehrlichia equi* (*E. equi*), causante de ehrlichiosis granulocítica equina y a la *Ehrlichia phagocytophilum* (*E. phagocytophilum*), que produce la enfermedad en bovinos y ovinos (López *et al.*, 2003). Este agente se distribuye actualmente en Estados Unidos, Europa, África, Centro y Sudamérica (Dumler *et al.*, 2001). Investigaciones recientes indican que el agente productor de la EGH, *E. equi* y *E. phagocytophilum* son una misma especie, denominándola actualmente como *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) (Dumler *et al.*, 2001).

En Venezuela, a partir de 1996 han sido identificadas las especies *E. canis*, *A. platys*, *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* por técnicas de Inmunofluorescencia indirecta y PCR (De Moraes *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 1997).

En Chile, en octubre de 1998 fueron reconocidos serológicamente los primeros casos de ehrlichiosis canina causada por *E. canis*. Los perros eran provenientes del sur de Santiago de Chile. Desde ese año hasta la fecha se ha ido incrementando el número de casos en toda la Región Metropolitana, constituyéndose hoy en día en una enfermedad cada vez más común en los caninos, en los meses de primavera y verano (López *et al.*, 2003).

En Brasil, se han detectado anticuerpos contra *E. canis* desde hace algunos años mediante técnicas de ELISA y fue identificada por primera vez por técnicas de PCR en el 2003 (Dagnone *et al.*, 2003). Así también en el 2002, se detectaron anticuerpos contra *E. chaffeensis* en el Estado de Minas Gerais (De Moraes *et al.*, 2004).

En Perú, recientemente se ha encontrado una seroprevalencia de 16,5% para ehrlichiosis canina detectándose anticuerpos contra *E. canis* mediante la técnica indirecta de ELISA, en tres distritos de Lima, confirmándose la exposición a este agente (Adrianzén, 2002), debiendo investigarse con mayor dedicación a fin de determinar la cinética de esta enfermedad en nuestro país.

Últimamente, se ha diagnosticado otro agente causal de ehrlichiosis granulocítica humana, *Ehrlichia ewingii* (*E. ewingii*), patógeno para perros (López *et al.*, 2003). Este

agente ha sido identificado hasta la fecha sólo en los Estados Unidos, ocasionando enfermedad clínica en caninos con cuadros de poliartropatías (Dumler *et al.*, 2001). La *Neorickettsia risticii* (*N. risticii*), causante de la fiebre del Potomac o ehrlichiosis monocítica equina, sólo ha sido identificada en los Estados Unidos (Sainz *et al.*, 2000), así como *Neorickettsia helminthoeca* que afecta a cánidos (Dumler *et al.*, 2001).

Recientemente en España, se ha realizado el primer aislamiento de *E. canis* en animales naturalmente infectados en cultivo celular (células DH82), así como su caracterización molecular. Esta especie guarda mucha similitud con especies aisladas en Venezuela, Japón e Israel (Aguirre *et al.*, 2004).

2.2. ENFERMEDADES EHRLICHIALES EN CANINOS

Inicialmente las especies ehrlichiales se dividían en tres clases, basándose en las “células blanco” que infectaban, teniendo especies monocíticas, granulocíticas y trombocíticas. Algunas de ellas pueden infectar más de un tipo celular (Neer, 2000).

2.2.1. EHRLICHIOSIS MONOCÍTICA CANINA (EMC)

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC), es una enfermedad infecciosa causada principalmente por *E. canis* la cual infecta células mononucleares (monocitos y linfocitos). El agente causal es un microorganismo intracelular obligado, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae* (Dumler *et al.*, 2001).

El vector principal es el *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata café del perro (Groves *et al.*, 1975), demostrándose también la transmisión experimental de la enfermedad por *Dermacentor variabilis* (Jonson *et al.*, 1998). Por lo que la enfermedad podría presentarse donde quiera que el vector se encuentre, principalmente en zonas de clima

tropical o en las estaciones calurosas de los climas mediterráneos (Ettinger, 1992; Neer, 2000; Parnell, 2004).

La *E. canis* puede afectar a múltiples especies, entre ellas cualquiera de la familia *Canidae*, sosteniéndose que especies como el zorro, coyote y chacal son reservorios naturales (Neer, 2000). La ehrlichiosis es una enfermedad que no presenta ninguna afinidad por sexo (Harrus *et al.*, 1997b), pero si se ha descrito mayor sensibilidad en edades medias y en la raza Pastor Alemán en donde también la sintomatología suele ser más severa y de peor pronóstico (Harrus *et al.*, 1997b; Ristic y Holland, 1993; Nyindo *et al.*, 1980)

La sintomatología inicialmente es inaparente y es probable confundirla con otras infecciones (leptospirosis, babesiosis y anemias deficitarias). Posterior a esta etapa deviene una fase subclínica asintomática de duración variable. En esta fase el sistema inmune del animal juega un papel muy importante en la eliminación del agente. De no ser así, ésta progresa a una etapa crónica caracterizada por pancitopenia debido a aplasia medular (Neer, 2000; Harrus *et al.*, 1999; Ettinger, 1992).

Esta enfermedad cursa con diversas alteraciones hematológicas, tales como trombocitopenia, anemia y leucopenia de intensidades variables, dependiendo de la patogenicidad del agente y la susceptibilidad del hospedero (Parnell, 2004; Harrus *et al.*, 1999; Ettinger, 1992; Neer, 2000). Respecto a la bioquímica sanguínea, la hiperproteïnemia (hipergammaglobulinemia) es la alteración típica de los animales infectados (Neer, 2000; Harrus *et al.*, 1999; Ettinger, 1992; Parnell, 2004; Sainz *et al.*, 2000).

La detección directa del microorganismo se realiza mediante el examen de un frotis teñido de sangre periférica de un animal con sintomatología clínica, siendo éste poco sensible por el bajo porcentaje de pacientes con detección de formaciones morulares intracitoplasmáticas (4%) (Ettinger, 1992). La detección serológica se realiza mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) o por la técnica indirecta de ELISA (De Morais *et al.*, 2004).

La *E. chaffeensis* también pueden infectar a los caninos de manera natural (López *et al.*, 1999) pero en menor frecuencia, provocando signos clínicos agudos similares a los causados por *E. canis* (Kordick *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 1991). Según algunos autores la infección de caninos por otras especies ehrlichiales monocitotrópicas, producen manifestaciones clínicas leves en comparación a las que produce *E. canis* (López *et al.*, 1999).

2.2.2. EHRLICHIOSIS TROMBOCÍTICA CANINA

La ehrlichiosis trombocítica canina (ETC) o trombocitopenia cíclica infecciosa canina, es producida por la *E. platys* (actualmente *A. platys*) (Dumler *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). La *A. platys*, fue reportada inicialmente en perros de Florida en los Estados Unidos (Harvey *et al.*, 1978).

La enfermedad puede ser transmitida por el *R. sanguineus* u otras garrapatas (Arraga-Alvarado *et al.*, 1997; Harvey, 1993; Hibler *et al.*, 1986). La resolución de la enfermedad suele ser espontánea (Parnell, 2004; Ettinger, 1992; Neer, 2000).

Mediante la amplificación por técnicas de PCR y la secuenciación del gen *ARNr 16S*, se ha demostrado que la *A. platys* se relaciona con otras especies ehrlichiales pero infecta a plaquetas en lugar de leucocitos (Dumler *et al.*, 2001).

El microorganismo se multiplica sólo en plaquetas de caninos y puede ser transmitido por la inoculación sanguínea de un perro infectado a un perro libre de anticuerpos contra *A. platys* (Ettinger, 1992). Este agente no es considerado como muy patógeno, ni como causante de enfermedad y signos clínicos en los caninos (Neer, 2000).

El microorganismo ocasiona una parasitemia cíclica, presentando cuentas de plaquetas ondulantes (valores mínimos que posteriormente se normalizan). Este patrón cíclico seguido por trombocitopenia tiene un lapso de 1 a 2 semanas (Harvey *et al.*, 1978;

Hibler *et al.*, 1986). Con cada ciclo de parasitemia el número de plaquetas infectadas disminuye hasta que son detectadas esporádicamente y la trombocitopenia se vuelve menos pronunciada (Neer, 2000). Los episodios trombocitopénicos posteriores pueden producirse por mecanismos inmunomediados (Parnell, 2004).

No se suelen apreciar manifestaciones clínicas o éstas son mínimas, aunque la infección conjunta con otros patógenos transmitidos por garrapatas (*E. canis* o *B. canis*) pueden potenciarlas. La fiebre puede ser el único signo clínico y es rara la presencia de petequias, equimosis y epistaxis. Puede producirse uveítis anterior en los animales afectados (Parnell, 2004; Ettinger, 1992).

El diagnóstico se basa principalmente en las alteraciones hematológicas, (trombocitopenia y rara vez anemia) alteraciones bioquímicas (hipoalbuminemia), identificación del microorganismo en frotis sanguíneo (detección de inclusiones en plaquetas), inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) y técnicas moleculares (PCR). Esta especie posee una reactividad cruzada muy baja o nula con *E. canis* (Parnell, 2004).

Si bien la infección por *A. platys* rara vez produce una enfermedad clínica, debe considerarse en el diagnóstico diferencial de trombocitopenia en perros (Neer, 2000).

2.2.3. EHRLICHIOSIS GRANULOCÍTICA CANINA (EGC)

La especie ehrlichial que infecta a los granulocitos de caninos de manera natural es la *E. ewingii*, que sólo ha sido detectada en los Estados Unidos (Dumler *et al.*, 2001). Esta es una enfermedad clínicamente importante cuyos principales signos son la cojera y la tumefacción articular con marcha rígida (Neer, 2000).

Buller *et al.* en (1999) publicaron la comprobación por técnicas de PCR que la *E. ewingii* infectaba seres humanos, provocando signos clínicos agudos muy difíciles de

diferenciarlos de los provocados por *E. chaffeensis* o *A. phagocytophilum* (Buller *et al.*, 1999).

Los cuadros crónicos de la enfermedad con afección articular (poliartritis) se deben en un 81% a infecciones por cepas granulocíticas, como *E. ewingii* (Neer, 2000).

Los títulos a otras ehrlichias deben examinarse según el área geográfica y los signos clínicos. Los anticuerpos a *E. ewingii* reaccionan de forma cruzada con *E. canis* y *E. chaffeensis* y el uso de uno de estos antígenos detectará la infección con cualquiera de los tres. No es posible cultivar *E. ewingii* in vitro más allá del aislamiento en células primarias; por consiguiente, no se dispone de una prueba serológica específica (Neer, 2000).

2.3. CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE PATÓGENO

Desde hace muchos años existía la controversia acerca de la clasificación correcta de los microorganismos rickettsiales, siendo colocados como un grupo intermedio entre las bacterias y los virus. Actualmente ese concepto ha cambiado y son consideradas como bacterias, debido a la similitud genéticas con ellas (Carter, 1985).

2.3.1. GENERALIDADES DE LOS AGENTES RICKETTSIALES

Los microorganismos rickettsiales pertenecen al *Reino Proteobacteria*, clasificadas como alfa - proteobacterias gramnegativas, grupo que incluye un gran número de agentes oligotrofos (capaces de crecer en niveles bajos de nutrientes). Dentro de este Reino se encuentran también los géneros *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Vibrio*. Esta clasificación ha sido tomada del Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey, que actualmente se encuentra en su novena edición, el cual

ordena a los microorganismos basándose en las secuencias de oligonucleótidos firma del gen *ARNr 16S* (Prescott *et al.*, 1999).

Estos microorganismos se presentan en formas bacilares, cocoides o pleomórficas, presentando paredes típicas de bacterias gramnegativas con ausencia de flagelos (Prescott *et al.*, 1999). Las formas bacilares son cortas, mientras que las cocoides se presentan aisladas, en pares, cadenas cortas o en filamentos (Brooks *et al.*, 1999). Estas bacterias tienden a ser muy pequeñas, teniendo un diámetro de 0.3 a 0.5 μm . y una longitud de 0.8 a 2.0 μm . (Prescott *et al.*, 1999) Estos agentes teñidos son fáciles de visualizar con el microscopio de luz. Con la tinción de Giemsa muestran color azul, con la de Macchiavello color rojo en contraste con el citoplasma teñido de azul que las rodea (Brooks *et al.*, 1999; Carter, 1985).

Todos los microorganismos *Rickettsiales* son parásitos o mutualistas. Las formas parásitas crecen en diversos tipos celulares (eritrocitos de vertebrados, células retículo-endoteliales y células del endotelio vascular), habitando a menudo en artrópodos que se alimentan de sangre, como pulgas, garrapatas, ácaros o piojos, que actúan como vectores o como huéspedes primarios (Prescott *et al.*, 1999).

Una amplia variedad de animales son susceptibles a la infección de agentes rickettsiales. Éstas crecen fácilmente en el saco vitelino del embrión de pollo (la suspensión de saco vitelino contiene 10^9 partículas rickettsiales por ml.). Se pueden obtener preparaciones puras mediante centrifugación diferencial de las suspensiones del saco vitelino. Muchas especies de rickettsias crecen en cultivos celulares y por razones de bioseguridad, solo deben aislarse en laboratorios de referencia (Brooks *et al.*, 1999).

Los agentes rickettsiales pierden su actividad biológica cuando se almacenan a 0°C o se incuban por unas pocas horas a 36°C . Éstas crecen en diferentes partes de la célula (citoplasma o núcleo). Se ha sugerido que las rickettsias crecen mejor cuando el metabolismo de la célula huésped es bajo. En general, son rápidamente destruidas por el calor, desecación y sustancias químicas bactericidas (Brooks *et al.*, 1999).

2.3.2. PROPIEDADES DEL GÉNERO *EHRLICHIA SPP.*

Los microorganismos del género *Ehrlichia spp.* son pequeños, de forma cocoide o pleomórfica (Popov *et al.*, 1998) y toman un color azul oscuro o púrpura con las tinciones de tipo Romanowsky (coloración Wright). Las bacterias son encontradas en vacuolas (fagosomas) en el citoplasma de células eucarióticas “blanco o diana”, principalmente leucocitos, quienes inhiben la fusión del fagosoma con los lisosomas (Sainz *et al.*, 2000). Estas bacterias poseen muchos ribosomas y una fina red de hebras de ADN, además existen agrupaciones ribosomales en el citoplasma de la célula infectada, cerca de la membrana citoplasmática de la vacuola. (Rikihisa, 1996).

Estos microorganismos son aeróbicos y no crecen en medios bacteriológicos estándares, infectando células del sistema monocito-macrófago, granulocitos o plaquetas de seres humanos y de varias especies animales domésticas y silvestres (Vadillo *et al.*, 2002). Se reproducen por fisión binaria al igual que la mayoría de las bacterias (Sainz *et al.*, 2000). Las ehrlichias se producen en laboratorio utilizando líneas de cultivos celulares y dentro de las más comunes están las monocapas de pulmón de embrión humano (HEL), fibroblastos (HEL 299), células renales de mono verde (Vero) y algunas líneas de carcinoma (HeLa) (Brouqui *et al.*, 1994). Estos microorganismos carecen de la ruta glucolítica y no utilizan glucosa como fuente de energía, sino que oxidan glutamato y productos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como el succinato. Presentan un sistema de transporte mediado por transportador, de tal forma que los nutrientes y las coenzimas de la célula huésped se absorben y se utilizan de forma directa. Estos microorganismos captan NAD y uridina glucosa difosfato, así como también realizan intercambio de ADP por ATP de la célula hospedero, de tal forma que la célula puede aportar gran parte de la energía necesaria para el crecimiento intracelular de las ehrlichias (Prescott *et al.*, 1999). La actividad metabólica de las ehrlichias es sensible a pH ácido (Dumler *et al.*, 2001).

Una de las características patogénicas más significativas de los miembros de este género es la selección de células de la serie mielocítica como células diana. Estas especies

muestran una cierta especificidad hacia el hospedero, existiendo evidencia de infecciones en hospederos no habituales (Vadillo *et al.*, 2002).

Dentro del ciclo biológico general de las especies ehrlichiales se pueden distinguir dos formas típicas dentro del fagosoma. Los *cuerpos elementales* (CE), que tienen un diámetro de 0,5 – 0,9 μm . se dividen por fisión binaria para dar lugar a los *cuerpos reticulares* (CR) de 1,5 – 2,5 μm . los cuales son similares a los cuerpos vistos en el género *Chlamidia spp.* (Popov *et al.*, 1998), éstos a su vez se dividen produciendo las típicas mórulas (formadas incluso por más de 40 cuerpos elementales) que pueden llegar a tener un tamaño de 4 – 5 μm . (Sainz *et al.*, 2000).

Rikihisa, (1996) clasificó las formaciones o inclusiones ehrlichiales de la siguiente forma (Véase Foto N° 1) :

- *Inclusiones pequeñas* (0.2 – 0.4 μm) : Denominadas también, “formas densas” similares a los cuerpos elementales (CE) clamidiales.
- *Inclusiones relativamente largas* (0.8 – 1.5 μm) : Denominadas también, “formas ligeras”, similares a los cuerpos reticulares (CR) que son observadas en especies muy patógenas del género *Ehrlichia spp.*

Sin embargo, el ciclo de vida de las ehrlichias que es similar al del género *Chlamidia spp.*, no ha sido completamente demostrado. Éstas, están revestidas por una delgada membrana externa y otra membrana interna. Diferentes miembros del género *Rickettsia spp.* y miembros del género *Ehrlichia spp.* presentan muy delgada la membrana externa (Rikihisa, 1996).

Fotografía N° 1.- Microestructura de las “mórulas” de *Ehrlichia chaffeensis* dentro de la célula hospedero.



FLECHA VERDE : Apéndices tubular extracelular.

FLECHA NARANJA : *Ehrlichia chaffeensis* en división (Fisión binaria).

Morfológicamente, los miembros del género *Ehrlichia* spp. aparentemente no contienen cantidades significantes de peptidoglicano (Rikihisa, 1996). La ausencia del peptidoglicano puede deberse a diferencias entre las asociaciones covalentes y no covalentes de las proteínas de la membrana externa (Popov *et al.*, 1998).

Las proteínas Thio-Disulfuro Oxidoreductasas son proteínas afines a puentes disulfuro y han sido determinadas recientemente en *E. chaffeensis* y *E. canis*. Estas proteínas son consideradas como factores importantes en el ciclo de vida y patogénesis de la enfermedad, ya que cumplen un papel vital en el transporte intramolecular hacia el interior de los cuerpos ehrlichiales (McBride *et al.*, 2002). Estas mismas proteínas han sido observadas en *Anaplasma marginale* (Vidotto *et al.*, 1994) y especies del género *Chlamidia* spp. (Hatch *et al.*, 1984).

El tamaño del genoma de las especies del género *Ehrlichia* spp. es relativamente pequeño, aproximadamente de 1 Mb. Por ejemplo el genoma de *Anaplasma phagocytophilum* tiene 1.5 Mb.; *E. chaffeensis* 1.2 Mb. y *E. sennetsu* 0.9 Mb., siendo determinados por técnicas electroforéticas (Dumler *et al.*, 2001).

Las diferencias en la estructura de las mórulas de estas bacterias y sus interrelaciones con la “célula blanco”, así como el estudio de las secuencias de bases del *ARNr 16S*, permitieron la posterior clasificación por genogrupos (Vadillo *et al.*, 2002).

2.3.2. RECLASIFICACIÓN DEL ORDEN *RICKETTSIALES*

El Orden *Rickettsiales* es un orden diverso que contiene tres familias : *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* y *Anaplasmataceae* y muchos géneros patógenos que infectan diversas especies de vertebrados (Greene, 1997).

Las especies del género *Ehrlichia* spp. se incluían dentro de la Familia *Rickettsiaceae* y se clasificaban principalmente por sus células blanco, es decir, se tenían

cepas monocitotrópicas, granulocitotrópicas y trombocitotrópicas. Además, se sabía que algunas especies tenían más de una célula blanco, tales como *E. chaffeensis*, *E. risticii* y *E. phagocytophila* (Neer, 2000).

Neer (2000), clasificó las especies ehrlichiales de la siguiente manera, dependiendo de la “célula blanco o diana” :

MONOCITOTRÓPICAS

- ***Ehrlichia canis*** : Afecta naturalmente a caninos e infecta células mononucleares y linfocitos.
- ***Ehrlichia chaffeensis*** : Afecta naturalmente a humanos, perros y venados e infecta células mononucleares, neutrófilos y linfocitos.
- ***Ehrlichia sennetsu*** : Afecta naturalmente a humanos e infecta células mononucleares.
- ***Ehrlichia risticii*** : Afecta naturalmente a caballos e infecta células mononucleares, células cebadas y enterocitos.
- ***Ehrlichia bovis*** : Afecta naturalmente a los bovinos e infecta monocitos y macrófagos.

GRANULOCITOTRÓPICAS

- ***Ehrlichia ewingii*** : Afecta naturalmente a perros e infecta neutrófilos y eosinófilos.
- ***Ehrlichia equi*** : Afecta naturalmente a caballos, perros, humanos y llamas e infecta neutrófilos y eosinófilos.

- ***Agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (AEGH)*** : Afecta principalmente a humanos, caballos y perros e infecta neutrófilos.
- ***Ehrlichia phagocytophila*** : Afecta principalmente ovejas, bovinos y visones e infecta a neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

TROMBOCITOTRÓPICAS

- ***Ehrlichia platys*** : Afecta naturalmente a perros e infecta únicamente plaquetas.

OTROS

- ***Cowdria ruminantium*** : Afecta naturalmente a los bovinos e infecta células endoteliales, macrófagos y neutrófilos.

El género *Ehrlichia spp.* a inicios de la década de los 90 empezó a sufrir múltiples cambios en la clasificación de las especies, teniendo como base 3 grupos; el primero formado por *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*. El segundo por *E. equi* y *E. phagocytophilum* y el tercer grupo formado por *E. risticii* y *E. sennetsu*. Aún no se clasificaba plenamente la *Ehrlichia platys* en algún grupo mencionado anteriormente. Esta clasificación se fue dando por las reacciones cruzadas a nivel serológico entre las especies (Greene, 1997).

Las enfermedades ehrlichiales que se dividían en un principio por la célula blanco, actualmente se clasifican por genogrupos, contruyéndose un árbol filogenético (Parnell, 2004). Se ha incorporado información acerca de la biología molecular de las especies ehrlichiales que antes se desconocía. Inclusive, algunas especies del género *Ehrlichia spp.*,

incluyendo algunas que parasitan canes, fueron transferidas para el género *Anaplasma spp.* (De Moraes *et al.*, 2004).

El gen ribosomal *ARNr 16S* de algunas especies comunes del género *Ehrlichia spp.* fue secuenciado. Debido a la homología en la secuencia de los genes, las ehrlichias son relativamente idénticas al género *Rickettsia spp.* (Dumler *et al.*, 2001). El análisis de este gen determinó que el género *Rickettsia spp.* con los géneros *Ehrlichia spp.*, *Cowdria spp.*, *Anaplasma spp.* y *Wolbachia spp.* son similares en un 84%. En el género *Ehrlichia spp.* existen diferencias entre especies del mismo género, así como con el género *Rickettsia spp.* (Dumler *et al.*, 2001). La secuenciación de estos genes determinó que la *Familia Anaplasmataceae* esta dividida en 4 géneros agrupados en 3 distintos grupos genéticos (genogrupos), con cerca de 7-15% de secuencias diferentes entre cada grupo (Dumler *et al.*, 2001), clasificando los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Popov *et al.*, 1998).

Los genogrupos actualmente están conformados de la siguiente manera según la publicación hecha por Dumler *et al.* en el 2001 :

El *Genogrupo 1* ha sido renombrado como género *Ehrlichia* y está constituido por *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii* y *E. ruminantium* (Dumler *et al.*, 2001). Estas especies forman grandes mórulas con muchas bacterias, a menudo suspendidas en una matriz fibrilar, encontrándose las mitocondrias y el retículo endoplasmático de la célula infectada en agregados muy cercanos a la mórula, incluso en contacto con su membrana (Vadillo *et al.*, 2002).

El *Genogrupo 2* ha sido renombrado como el género *Anaplasma*, el cual está contituido por *E. equi*, *E. phagocytophilum*, agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) y *E. platys* (Yu *et al.*, 2001). *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) también entra en este grupo, siendo 97% similar a las especies de este genogrupo (Dumler *et al.*, 2001). Este género presenta mórulas no fibrilares y las mitocondrias así como el retículo endoplasmático no contactan con la membrana de la mórula (Vadillo *et al.*, 2002).

La diferencia entre la *E. equi*, *E. phagocytophilum* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) es como máximo de 3 nucleótidos, por lo tanto se determinó que eran una misma especie (Dumler *et al.*, 2001).

En el Genogrupo 3 están *E. sennetsu*, *E. risticii*, el agente de *Stellantchasmus falcatus* (Agente SF) aislado del gusano *S. falcatus* (parásito de peces) en Japón y *Neorickettsia helminthoeca*. Este genogrupo ha sido renombrado como género *Neorickettsia* (Dumler *et al.*, 2001). Estas especies se desarrollan en pequeñas vacuolas individuales que no se funden unas con otras, dividiéndose junto con los organismos ehrlichiales (Vadillo *et al.*, 2002).

Los miembros del género *Wolbachia spp.* y simbioses severos de insectos conforman un probable cuarto genogrupo. Actualmente se desconoce si estas especies causan enfermedad en vertebrados (Dumler *et al.*, 2001).

De acuerdo con la comparación de la secuencia del gen *ARNr 16S*, el género *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* de la Familia *Anaplasmataceae*, no están relacionados con el Orden *Rickettsiales* y han sido reclasificados dentro del género *Mycoplasma spp.* (Dumler *et al.*, 2001).

El nuevo genogrupo de *Ehrlichia*, excepto por *E. ewingii* y *E. ruminantium*, infecta monocitos y macrófagos. *Ehrlichia ewingii* infecta granulocitos y *E. ruminantium* infecta células de endotelio vascular y neutrófilos. El grupo del género *Anaplasma* infecta granulocitos, plaquetas y glóbulos rojos. El grupo *Neorickettsia* infecta monocitos y macrófagos. *Neorickettsia risticii* adicionalmente infecta células del epitelio intestinal y mastocitos (Dumler *et al.*, 2001).

La importancia clínica de esta nueva clasificación es que tal vez los veterinarios se enteren pronto de nuevos agentes rickettsiales y las enfermedades que causan (Greene, 1997).

2.4. PATOGÉNESIS DE LA EHRLICHIOSIS CANINA POR *EHRLICHIA CANIS*

La enfermedad posee un período de incubación (PI) de aproximadamente 8 a 20 días (Sainz *et al.*, 2000), seguido por una fase aguda o temprana, para posteriormente alcanzar una etapa subclínica asintomática y finalmente llegar a una fase crónica, que es la etapa final de la enfermedad (Harrus *et al.*, 1997a; Neer, 2000).

En la última década ha sido revisada extensamente esta enfermedad, y los esfuerzos han sido dirigidos a elucidar la patogénesis de la enfermedad aguda. El mejor entendimiento de los principales mecanismos involucrados en la patogénesis se han convertido en gran apoyo para el clínico. Los mecanismos patogénicos de esta enfermedad pueden ayudar a entender los que ocurren en la ehrlichiosis monocítica humana (EMH) y la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) (Harrus *et al.*, 1999).

2.4.1. INGRESO DEL AGENTE Y LA FASE AGUDA

La infección del hospedero vertebrado ocurre después que una garrapata ha ingerido sangre de un animal infectado, de esta forma las secreciones salivales de la garrapata contaminan el área de alimentación en el hospedero susceptible, ocasionando el pasaje del microorganismo vía mecánica. Además, el microorganismo también se transfiere por transfusiones sanguíneas de donadores infectados, siendo ésta última una vía muy poco frecuente (Neer, 2000).

Posterior al período de incubación, se observa la fase aguda, la cual tiene una duración de 2 a 4 semanas. En esta fase se multiplican los microorganismos en células mononucleares (macrófagos y linfocitos) por fisión binaria y se diseminan a la totalidad del cuerpo (Neer, 2000; Ettinger, 1992). La replicación inicialmente se da en leucocitos mononucleares circulantes, los que luego, colonizan los órganos conformados por células

de tipo mononuclear, tales como el bazo, hígado, médula ósea y nódulos linfáticos donde provocan una hiperplasia con infiltración de células plasmáticas (Neer, 2000).

E. canis suele provocar lesiones inflamatorias y vasculitis, fundamentalmente de origen inmunomediado, por depósito de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) (Parnell, 2004). En algunos casos, el cuadro puede tornarse muy grave y desencadenar el cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID) poniendo en grave riesgo la vida del animal (Sainz *et al.*, 2000).

La trombocitopenia, es el hallazgo más común y consistente en la ehrlichiosis canina (Waner *et al.*, 1995), así como la anemia y la leucopenia (Neer, 2000; Ettinger, 1992). Estas anormalidades hematológicas rara vez se presentan simultáneamente y son más típicas diversas combinaciones (Greene, 1997). La trombocitopenia se da por el mayor consumo, secuestro y destrucción de plaquetas, reduciéndose la vida media de las mismas. Esto se origina principalmente por la vasculitis que afecta a las pequeñas arterias, por la respuesta del sistema inmunológico y/o de coagulación (Kakoma *et al.*, 1978; Pierce *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1975). Éste es un efecto causado por la infección, pero casos sin trombocitopenia también se han reportado (Sainz *et al.*, 2000).

Es frecuente la presencia de trombocitopenia y trombocitopatías motivadas fundamentalmente por procesos inmunomediados. Por la misma razón, en ocasiones se puede presentar leucopenia y anemia en los pacientes (Sainz *et al.*, 2000). Pueden ocurrir anemia positivas a Coombs secundarias al recubrimiento inespecífico de glóbulos rojos por globulinas o subsecuentes a una respuesta inmunitaria específica a antígenos de eritrocitos (Greene, 1997).

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos antiplaquetarios (AAP) en el suero de los animales infectados con *E. canis*, apoyando la idea de la destrucción plaquetaria por parte del sistema inmune en esta fase (Harrus *et al.*, 1996a; Waner *et al.*, 1995). Los AAP han sido detectados desde el 7º hasta el 17º día post-infección experimental en caninos (Harrus *et al.*, 1996a). Estos anticuerpos han sido demostrados en pacientes con EGH en el

80% de los casos (Wong *et al.*, 1998). La inducción para la producción de los AAP es ejercida por los antígenos ehrlichiales, que aparentemente son antigénicamente similares a las moléculas plaquetarias, esto explica porqué el sistema inmune está involucrado en la destrucción celular. En esta etapa aún no se desarrolla daño medular, por el contrario ante el volumen plaquetario disminuido se presenta una trombopoyesis activa (Waner *et al.*, 1995).

Además, se ha encontrado que en perros con ehrlichiosis existe una citosina sérica, llamado factor de inhibición de la migración plaquetaria (PMIF) (Greene, 1997; Neer, 2000) y sus valores se relacionan de manera inversa con la cifra de plaquetas. Las concentraciones más altas de PMIF se relacionan con cepas más virulentas de *E. canis*. El PMIF impide la migración de estos elementos y es elaborado por linfocitos cuando se exponen a monocitos infectados. La función de las plaquetas (medida mediante respuestas de agregación) se observa disminuida y, aunada a la cifra baja, contribuye a la hemorragia (Neer, 2000). Los AAP son también responsables de la disfunción plaquetaria, disminuyendo los mecanismos de agregación al adherirse a éstas (Lovering *et al.*, 1980; Harrus *et al.*, 1996b). En algunos perros infectados, la gammopatía da por resultado trombocitopenia (Neer, 2000). La fase aguda suele resolverse en forma espontánea (Parnell, 2004; Neer, 2000; Ettinger, 1992).

En esta etapa la hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (hipergammaglobulinemia) son las anormalidades bioquímicas predominantemente encontradas en perros infectados con *E. canis* (Harrus *et al.*, 1996c). La hipoalbuminemia encontrada es la consecuencia de la pérdida periférica de albúmina por los fluidos inflamatorios edematosos como resultado del incremento de la permeabilidad vascular (Woody y Hoskins, 1991), pérdida de sangre, descenso en la producción de proteína debido a una concurrente enfermedad hepática leve (Reardon y Pierce, 1981a), o debido a glomerulopatía con cambios mínimos. Como la síntesis es regulada por la presión oncótica, el descenso en las concentraciones de albúmina puede actuar como mecanismo compensatorio por el estado de hiperglobulinemia, tratando de mantener la presión oncótica y previniendo el incremento en la viscosidad de la sangre (Woody y Hoskins, 1991)

La hipergammaglobulinemia en la EMC es usualmente policlonal. Las gammopatías monoclonales ocurren raramente y pueden resultar en hiperviscosidad y ser asociadas con manifestaciones clínicas (Harrus *et al.*, 1996c; Hoskins *et al.*, 1983). Las concentraciones de gammaglobulina se incrementan durante la fase febril de la ehrlichiosis y persiste durante la fase subclínica y crónica de la enfermedad (Ristic y Holland, 1993).

En esta fase se mantiene la hipergammaglobulinemia, la hipoalbuminemia, y se observa plasmocitosis a nivel de médula ósea, encontrándose en la mayoría de los casos gammopatías de tipo policlonal, siendo raros los casos con gammopatías monoclonales (Neer, 2000).

Existe una correlación baja entre la concentración de gammaglobulinas y los títulos de anticuerpos específicos contra *E. canis* (Harrus *et al.*, 1996c; Reardon y Pierce, 1981a). La pobre correlación entre estos dos parámetros sugiere que la producción de anticuerpos inducida por *E. canis* no es específica contra el agente, y por lo tanto que los anticuerpos *anti-E.canis* no son la principal fuente de gammaglobulinas. Este fenómeno se conoce que ocurre en otras enfermedades con estimulación antigénica prolongada (Tizard, 2002) y sugiere una exagerada respuesta inmune humoral con efectividad inadecuada (Reardon y Pierce, 1981b).

Las concentraciones de globulinas alfa-2 y beta-2 se encuentran también incrementadas en perros infectados (Harrus *et al.*, 1996c). Con el fin de elucidar la respuesta proteínica que ocurre en la fase aguda de los perros infectados con *E. canis*, han sido estudiadas las concentraciones de la proteína reactiva C y las beta-globulinas (Rikihiya *et al.*, 1994a).

Los niveles de proteína reactiva C se elevaron gradualmente entre los días 4 y 6 post-infección y declinaron hacia niveles de preinfección al día 34, sosteniendo la hipótesis de que existe respuesta proteínica en la fase aguda de la EMC (Greene, 1997). El incremento en las concentraciones de globulina alfa-2 pueden ser la consecuencia del daño tisular y la inflamación, siendo esto demostrado ya que la síntesis de globulina alfa-2 por el

hígado fue estimulada por mediadores de leucocitos endógenos en respuesta al daño tisular y la inflamación (Greene, 1997).

En esta etapa suelen afectarse los riñones por factores humorales. En las infecciones agudas es común que haya alteración de la permeabilidad glomerular. La pérdida de proteínas depende de una glomerulopatía de cambios mínimos. Las tinciones inmunofluorescentes revelan depósitos leves a moderados de inmunoglobulinas en los ovillos glomerulares y el mesangio. Estos cambios patológicos explican la pobre respuesta a la antibioticoterapia en los casos de ehrlichiosis con glomerulonefritis (Greene, 1997).

2.4.2. FASE SUBCLÍNICA O SILENCIOSA

La fase subclínica se establece cuando el animal sobrevive a la fase aguda y se presenta de manera espontánea o por un tratamiento inefectivo (Harrus *et al.*, 1998). Se caracteriza por la persistencia del microorganismo y el alza en los títulos de anticuerpos. Tiene una duración promedio de 6 a 9 semanas pudiendo permanecer por varios años (Neer, 2000).

La persistencia del antígeno en las células infectadas obra como estímulo para el sistema inmune. Los títulos de anticuerpos se elevan grandemente en esta fase y los animales inmunocompetentes por lo general eliminan al microorganismo en esta etapa. Los pacientes que no eliminan la infección progresan hasta la fase crónica. Los signos clínicos están ausentes pero persisten los cambios hematológicos, principalmente la trombocitopenia (Ettinger, 1992; Sainz *et al.*, 2000). Esto indica que los cambios patológicos continúan, sólo que no son observados clínicamente (Harrus *et al.*, 1999). Como consecuencia de la infección se produce una respuesta inmune humoral importante que a menudo no es capaz de eliminar el agente patógeno (Sainz *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que el bazo es el órgano más importante para la *E. canis* en esta etapa de la enfermedad, así como la médula ósea (Harrus *et al.*, 1999).

Nyindo *et al.* (1991) y Rikihisa *et al.* (1992) determinaron que los aspirados de bazo utilizando técnicas moleculares, tales como PCR o EITB son muy útiles para la determinación del estadio de la enfermedad. Determinó que en la fase aguda, contra proteínas de bajo peso molecular (<30 kDa) se producen los anticuerpos. Así como en la fase subclínica los anticuerpos se producen contra proteínas de alto peso molecular (> 30 kDa).

La hiperglobulinemia (hipergammaglobulinemia) e hipoalbuminemia son alteraciones bioquímicas más frecuentes en esta etapa, permaneciendo en las siguientes fases de la enfermedad (Harrus *et al.*, 1996c). La hiperglobulinemia tiene un efecto inhibidor de la migración y adherencia de plaquetas circulantes (Greene, 1997; Harrus *et al.*, 1996b).

2.4.3. FASE FINAL O CRÓNICA

La ehrlichiosis crónica ocurre en los perros que no logran montar una respuesta inmune eficiente contra el microorganismo (Sainz *et al.*, 2000).

En esta etapa de la enfermedad se pueden presentar cuadros leves, manifestando una enfermedad vaga con pérdida de peso y con alteraciones hematológicas moderadas. La forma grave se caracteriza por deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos que da por resultado pancitopenia. La gravedad de la enfermedad es mayor con ciertas cepas del microorganismo, cuando hay una enfermedad concomitante en algunas razas (Pastor alemán) y en los animales jóvenes (Neer, 2000).

La hipergammaglobulinemia y la hipoalbuminemia permanecen en esta etapa de la enfermedad debido a la estimulación antigénica persistente y es sugestiva de una respuesta inmune inadecuada (tal vez una respuesta celular ineficiente), puesto que para la inmunidad son esenciales los anticuerpos y las células inmunes (Ettinger, 1992). En su mayoría se

mantiene la detección de gamopatías policlonales. Las globulinas beta pueden aumentar en esta etapa de manera variable (Greene, 1997).

La hipoplasia medular conlleva al estado pancitopénico que se presenta en las etapas crónicas graves. Por lo tanto, existe una tendencia hemorrágica marcada en esta fase debido principalmente a la trombocitopenia persistente y trombocitólisis marcada (Ettinger, 1992).

2.5. RESPUESTA INMUNE A LA ENFERMEDAD

2.5.1. RESPUESTA INMUNE CONTRA AGENTES INTRACELULARES

Múltiples bacterias intracelulares son capaces de multiplicarse dentro de los macrófagos. El *Corynebacterium pseudotuberculosis* es resistente a las enzimas lisosómicas. Otras bacterias, como las micobacterias, *Aspergillus flavus*, *Brucella abortus* y *Chlamydia psittaci* impiden que los lisosomas se fusionen con el fagosoma. Los lisosomas permanecen distribuidos en el citoplasma, y las bacterias continúan su proliferación. Otro método es escapar del fagosoma y mantenerse libre en el citoplasma. Algunas micobacterias y *L. monocytogenes* usan éste método (Tizard, 2002).

Las micobacterias son capaces de evitar la acidificación del fagosoma impidiendo la fusión de la ATPasa de la bomba de protones en la membrana vacuolar, de modo que las catepsinas lisosómicas permanecen inactivas. La citocina IFN-gamma producida por los linfocitos T cebados activa al macrófago para que acidifique el fagosoma y mate a las micobacterias. Contra esto los microorganismos inducen la síntesis de IL-6 por parte de las células hospedadoras para prolongar su propia supervivencia (Tizard, 2002).

Actualmente, la concepción que la respuesta mediada por anticuerpos protege contra patógenos extracelulares y que la respuesta inmune celular protege contra patógenos intracelulares ha sido modificada y extendida por el paradigma Th1 / Th2, lo cual indica la

división de labores de los linfocitos T. Teniendo que para patógenos intracelulares se desencadena la respuesta Th1 que promueve inflamación granulomatosa, y para patógenos extracelulares se inicia una respuesta Th2 la cual resulta en la producción de anticuerpos para el control de patógenos extracelulares y parásitos (Casadevall, 2003).

El suero inmune producido naturalmente contra agentes microbianos está compuesto por diversas moléculas de anticuerpos (varios isotipos). Pero el suero producido en todos los agentes no era útil, haciendo sospechar que los anticuerpos no destruían al agente. Recientemente, la tecnología de hibridación ha sido de gran utilidad, para producir anticuerpos monoclonales, los cuales inducen protección pasiva y están dirigidos contra proteínas específicas de agentes microbianos que se pensaba cumplían su ciclo biológico en un medio intracelular únicamente, llegando a conocer que dentro de su ciclo mantienen un período extracelular. Ejemplos son las investigaciones hechas en *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania mexicana*, *Micobacterium tuberculosis* e *Histoplasma capsulatum* (Casadevall, 2003).

La modificación de la reacción inmune por parte del agente intracelular es otro mecanismo para evitar ser eliminado del hospedero. Cambios en la respuesta de linfocitos Th1 a linfocitos Th2 se presentan en las infecciones por micobacterias, y esto contribuye a que la infección se torne progresivamente crónica. Para la evasión de la reacción inmune los organismos intracelulares se valen de múltiples mecanismos, evitando la fagocitosis, secretando sustancias inhibitoras o evitando la adherencia del complemento a la superficie bacteriana (Roitt y Delves, 2003).

Las consecuencias adversas de las inmunoreacciones son las reacciones hipersensibles. Estas reacciones explican en muchas infecciones diversas alteraciones patológicas de origen inmunomediado (Roitt y Delves, 2003).

2.5.2. RESPUESTA INMUNE EN FASE AGUDA

Muchos hallazgos sostienen la idea que la respuesta inmune juega un papel muy importante en la patogénesis de la ehrlichiosis monocítica canina aguda (EMC). Estos hallazgos incluyen una fuerte infiltración de células plasmáticas en el parénquima de diversos órganos, la hipergamaglobulinemia policlonal (no correlacionada con los títulos de anticuerpos específicos contra *E. canis*), Test de Coomb's positivos, Test de autoaglutinación positivos y la producción de anticuerpos antiplaquetarios (AAP) resultantes de la infección experimental de perros con *E. canis* (Harrus *et al.*, 1996c; Woody y Hoskins, 1991).

La fiebre y algunos signos clínicos inespecíficos (depresión, anorexia y fiebre) observados en los perros infectados son causados por el incremento en la producción de interleucina-1 (IL-1) por células presentadoras de antígeno, células B o por productos pirógenos exógenos de la bacteria (Tizard, 2002).

El Pastor Alemán evidencia una mayor dificultad para eliminar a la *E. canis* en comparación con otras razas (Harrus *et al.*, 1997b; Nyindo *et al.*, 1980). La enfermedad en los Pastores Alemanes es más severa y tiene un pronóstico malo a diferencia de otras razas (Harrus *et al.*, 1997b). La dificultad racial se atribuye a la habilidad para elaborar una adecuada respuesta inmune celular y/o respuesta inmune humoral. Se tiene bien documentado que la respuesta celular contra *E. canis* es deficiente en Pastores Alemanes comparada con los perros de raza Beagle (Nyindo *et al.*, 1980). En este estudio no se encontraron diferencias significativas en la respuesta humoral entre estas dos razas (Harrus *et al.*, 1999).

La activación de células T fue propuesta en la patogénesis de la EMC, siendo necesaria en la interacción de la respuesta humoral y celular para una efectiva destrucción de la bacteria (Greene, 1997). Posteriormente, se sugirió que la respuesta celular es el más importante componente del sistema inmune que provee protección contra *E. canis* (Nyindo *et al.*, 1980). En perros experimentalmente infectados, persisten altos títulos de anticuerpos

seguido del tratamiento y la eliminación de la rickettsia. Estos anticuerpos mostraron no ser de valor protector cuando los perros fueron enfrentados a cepas homólogas o heterólogas de *E. canis* (Ristic y Holland, 1993). Así, la respuesta inmune humoral al parecer no juega un rol importante en la protección contra *E. canis* e inversamente, ha sido propuesta como contribuyente de la patogénesis de la enfermedad (Hildebrandt *et al.*, 1973; Ristic y Holland *et al.*, 1993).

Se ha determinado la importancia de los linfocitos T CD8+ los cuales se incrementan en la sangre periférica de perros infectados con *E. canis* (Page, 1995). El incremento de los linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales (*Natural Killer*) ocurre durante la infección como consecuencia de la citotoxicidad mediada por células (Weisser *et al.*, 1991). Recientemente, se realizó un estudio en el que se determinó la importancia de las células T CD8+, CD4+, así como de sustancias como el IFN-gamma, TNF-alfa y moléculas de anticuerpos contra la infección aguda experimental en ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos con *Ehrlichia muris*, organismo ehrlichial utilizado como modelo monocitotrópico de esta enfermedad (Feng y Walker, 2004).

Utilizando “noqueos” de genes específicos, se determinó que ratones con el gen noqueado que codifica el CMH-I se producía un 81% de casos fatales en animales infectados con *E. muris*. Asimismo, se produjo un 22% de casos fatales en ratones con el gen que codifica el CMH-II noqueado. Se produjeron 44% de casos fatales en animales con depleción única de linfocitos T CD4+ y un 80% de casos fatales con depleción de linfocitos T CD4+ y CD8+. La mayor contribución de las células T CD4+ en la inmunidad contra *E. muris* es la secreción de IFN-gamma, con roles adicionales en la aparición de la respuesta humoral y proveer ayuda para la proliferación de linfocitos T CD8+ (Feng y Walker, 2004).

Botelho de Castro *et al.* (2004) realizó un estudio infectando experimentalmente a 4 Pastores Alemanes con *E. canis*. Se tomaron muestras de nódulo linfático y bazo para determinar mediante inmunohistoquímica la cantidad de células T CD8+ y T CD3+, así como la detección de células B productoras de IgG e IgM. Se encontró que los niveles de células B productoras de IgG eran considerablemente altos en las muestras de los animales

infectados. Las células B productoras de IgM se encontraron levemente incrementadas en relación a los animales control. Respecto a las células T CD8+ se encontraron incrementadas en los nódulos linfáticos y en el bazo se redujo la cantidad en comparación con los controles. Finalmente, las células T CD3+ se incrementaron considerablemente en el bazo así como en los nódulos linfáticos, con excepción de la región folicular. Estos hallazgos indican que las células T CD8+ no se encuentran en cantidades considerables en el bazo, lo que explicaría la predilección de la *E. canis* por este órgano para realizar la persistencia intracelular, ya que el tipo celular más importante para la eliminación de la bacteria no se encuentra a nivel esplénico. Las células T CD3+ pueden ser T CD4+, pero este trabajo no pudo diferenciar linfocitos T CD4+.

El mecanismo realizado por el IFN-gamma y el TNF-alfa es sinérgico, ya que en ratones experimentales con depleción de ambas citocinas se produjo un 75% de casos fatales, siendo esta la primera evidencia directa *in vivo* de la importancia de estas citocinas como mecanismos defensivos del hospedero contra especies ehrlichiales. La función del IFN-gamma es la de limitar la disponibilidad de transferrina al agente ehrlichial, el cual es necesario como fuente de hierro para su crecimiento intracelular (Feng y Walker, 2004).

En humanos, existe un proceso denominado *Anemia de los procesos crónicos (APC)*, donde se indica que los cuadros anémicos vistos en diversas infecciones y cuadros neoplásicos pueden ser ocasionados por la presencia en circulación sanguínea de sustancias como IFN-gamma, TNF-alfa e IL-1, los cuales tienen un impacto negativo en la diferenciación de los precursores eritroides, en la producción de eritropoyetina y contribuyen a los defectos en la utilización del hierro. Es probable que este proceso explique la frecuencia alta de cuadros anémicos en ehrlichiosis canina (Forrellat y Fernández, 2002). Según el estudio de Buhles *et al.* (1974) los parámetros celulares sanguíneos regresaban a la normalidad hacia el final de su experimento en fase aguda con animales infectados por *E. canis*. Este hallazgo indica que la infección por esta bacteria ocasiona la supresión transitoria en la actividad productiva de la médula ósea, a nivel de la serie eritroide.

La formación de complejos inmunes se presenta principalmente por la antigenemia persistente y la producción de anticuerpos contra estas moléculas antigénicas liberadas tras la lisis celular en la fase aguda. Estas moléculas forman junto con los anticuerpos, inmunocomplejos que se depositan principalmente en vasos sanguíneos de pequeño calibre (capilares) ocasionando cuadros de vasculitis, (Roitt y Delves, 2003) afectando principalmente a los capilares del glomérulo renal, globo ocular y articulaciones. Estos inmunocomplejos activan moléculas de complemento que actúan como factor quimiotáctico, provocando una respuesta inflamatoria, ocasionan daño tisular. Esto explica la presentación de glomerulonefritis con pérdida de proteínas, así como uveítis anterior (opacidad corneal) y los cuadros de poliartritis (Tizard, 2002).

Estas alteraciones son evidencias de una respuesta hipersensible de tipo III (depósito de inmunocomplejos), siendo la glomerulonefritis de tipo I dentro de los cuadros renales por inmunocomplejos. Estos complejos suelen penetrar el endotelio del glomérulo, pero no la membrana basal. El daño continuo de los inmunocomplejos sobre las células endoteliales estimulan la producción de TGF-beta1. Esta citosina estimula a las células vecinas a producir fibronectina, colágena y proteoglucanos ocasionando el engrosamiento en la membrana basal. En algunos casos estos inmunocomplejos pueden penetrar la membrana basal y dañar las células mesangiales provocando además la producción de IL-6, la cual estimula la producción de células mesangiales, provocando con el tiempo fibrosis glomerular, que constituye la alteración crónica de esta enfermedad (Tizard, 2002).

La respuesta humoral hacia *E. canis* puede ser estudiada mediante electroforesis, inmunofluorescencia para anticuerpos, ELISA y EITB. El análisis de Inmunoblot ha mostrado que el suero inmune obtenido de perros infectados con *E. canis* reacciona con una gran variedad de proteínas de 21 hasta 160 kDa (Hegarty *et al.*, 1997; Iqbal *et al.*, 1994). La reacción inmune más fuerte ha sido mostrada contra las proteínas de aproximadamente 27 a 30 kDa (Breitschwerdt *et al.*, 1998; Hegarty *et al.*, 1997; Matthewman *et al.*, 1993; Rikihisa *et al.*, 1994b).

Los anticuerpos antiplaquetarios (AAP) son moléculas que se producen por interacción del antígeno con el sistema inmune. Aparentemente las células B poseen receptores autoanticuerpo de manera natural, los cuales entran en contacto con los antígenos de *E. canis*, siendo éstos similares antigénicamente a las moléculas de las plaquetas propias del organismo (Waner *et al.*, 1995).

El bazo juega un rol principal en la patogénesis de enfermedades inmunomediadas, y en casos refractarios al tratamiento médico, la esplenectomía puede ser indicada (Lewis y Meyers, 1996). La remoción del órgano dominante productor de anticuerpos, así como uno de los principales órganos del sistema fagocítico monocítico/macrófago son considerados los objetivos principales al esplenectomizar a los pacientes. El bazo es el principal sitio para la síntesis de algunas sustancias que actúan como opsoninas y promotores de fagocitosis. El bazo es el principal lugar para la síntesis de componentes del complemento. Por la eliminación de los macrófagos esplénicos y la reducción de los componentes del complemento y opsoninas, la fagocitosis postesplenectomía queda muy comprometida (Lockwood, 1983).

En la respuesta inmune contra *E. chaffeensis* recientemente se ha demostrado que los anticuerpos destruyen a la bacteria intracelular. El suero de animales que sufrieron la enfermedad fue purificado y administrado a ratones previamente infectados con la bacteria asociada a células. Este hallazgo indica que los anticuerpos (no tomados en cuenta para la eliminación de esta bacteria) aparentemente juegan un papel muy importante en la respuesta inmune del hospedero contra esta infección. Esto mismo ha sido notado en otras infecciones por agentes intracelulares obligados, haciendo pensar que existe una etapa extracelular en ciclo biológico de la bacteria que aún no se esclarece (Winslow *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que *E. chaffeensis* se replica fuera de las células hospedero. Se utilizó suero libre de células, el cual contenía microorganismos ehrlichiales. Tras 3 – 5 días en incubación a 37°C se determinó que las ehrlichias replicaron, pero perdieron su infectividad y virulencia después de 24 horas en el cultivo extracelular (Shu-yi Li *et al.*, 2003).

2.5.3. RESPUESTA INMUNE EN FASE SUBCLÍNICA

Actualmente, no se han realizado muchos trabajos utilizando modelos animales (roedores), para obtener mayor información acerca de la ehrlichiosis subclínica o fase persistente. Recientemente, Olano *et al.* (2004) realizaron un trabajo en el que se inoculó experimentalmente *E. canis* en perros y evaluaron los cambios histopatológicos correlacionándolos con la producción de anticuerpos, así como con la distribución y cantidad de agentes ehrlichiales en diversos tejidos. Para ello utilizaron pruebas como PCR a tiempo real (*Real Time* PCR), inmunofluorescencia indirecta (IFA), EITB e inmunohistoquímica. Determinaron que las ehrlichias se encontraban aún 150 días post-infección en los tejidos. Así también, encontraron una leve a moderada correlación entre los cambios histopatológicos y la cantidad de ehrlichias encontradas. Finalmente, el análisis serológico indicó inmunodominancia por parte de los antígenos de 200, 180, 100, 73-75, 45 y 28 kDa.

Para *E. canis* la inmunidad protectora es mantenida primariamente vía la respuesta inmune celular antes que la respuesta inmune humoral, siendo la respuesta humoral la que predomina en esta etapa (Harrus *et al.*, 1999). La etapa subclínica puede ocurrir en perros infectados con *E. canis* de manera natural o en animales infectados después de un corto período de tratamiento antibiótico insuficiente (oxitetraciclina y/o doxiciclina) (Ristic y Holland, 1993).

Debido a que el IFN-gamma es crucial para la eliminación en la etapa aguda de los agentes ehrlichiales, *E. chaffeensis* es capaz de establecer una infección persistente (período subclínico) en ratones experimentalmente infectados con el gen del CMH-II noqueado, en otras palabras con la activación de células T CD4+ anulada (Feng y Walker, 2004).

El cese de la actividad de replicación de las ehrlichias arrestadas en el bazo y médula ósea principalmente, permite que no se desencadene respuesta celular alguna, es decir el organismo no identifica al patógeno intracelular, lo que persiste es la producción

inespecífica de anticuerpos, en otras palabras el sistema ha quedado marcado para producir anticuerpos antiplaquetarios, antiehrlichiales y antieritrocíticos, los cuales mantienen las alteraciones hematológicas (trombocitopenia y anemia hemolítica) (Harrus *et al.*, 1996a).

2.5.4. VULNERABILIDAD INMUNE LIGADA A LA CRONICIDAD

Las condiciones para presentarse la fase crónica no están bien comprendidas aún, pero se cree que así como en la etapa aguda y subclínica el estado inmunológico del animal tenga gran importancia para la manifestación de esta etapa. Así también, factores como susceptibilidad racial, condiciones de stress, coinfecciones con otros parásitos, localización geográfica, la especie del agente o constantes reinfecciones en el animal pueden estar involucrados (Breitschwerdt *et al.*, 1998; Harrus *et al.*, 1997b; Hegarty *et al.*, 1997).

En esta etapa de la enfermedad se presenta daño medular, principalmente cuadros de aplasia medular en los casos graves. Esta lesión crónica a nivel de médula ósea es probable que sea producto del depósito de inmunocomplejos, así como de la destrucción de las células precursoras sanguíneas por parte del sistema inmune. De este modo, se destruyen lentamente las células hematopoyéticas, cuyo estímulo induzca la proliferación de tejido fibroso (Sainz *et al.*, 2000).

Se desconocen aún los mecanismos inmunológicos en esta etapa de la enfermedad, pero se sospecha que las respuestas celular y humoral están seriamente afectadas debido a la depleción de las poblaciones celulares circulantes (Sainz *et al.*, 2000).

Se sabe que los anticuerpos circulantes en las últimas etapas de la fase crónica tienden a caer a niveles muy bajos. Esto podría entenderse como una reacción debido a la ausencia de células productoras de anticuerpos (Greene, 1997).

2.6. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

2.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La infección por *Ehrlichia canis* puede causar un amplia gamma de signos clínicos, que varían incluso dentro y entre distintas localidades geográficas, esto depende tanto de la dosis infectante, raza del perro infectado, el estado inmunológico al momento de la infección, como de otras enfermedades concomitantes (Sainz *et al.*, 2000).

2.6.1.1. SIGNOS CLÍNICOS EN FASE AGUDA

La sintomatología de la ehrlichiosis es muy variada y con frecuencia es difícil la distinción clínica entre los estadios agudo y crónico (Parnell, 2004). Durante la fase aguda la sintomatología suele ser poco específica por lo que el diagnóstico no siempre es sencillo. Si no se diagnostica la enfermedad en fase aguda, ésta progresa a la forma subclínica en la que sólo se encuentran alteraciones laboratoriales (Sainz *et al.*, 2000). En algunos casos los signos pueden ser muy leves, pasando prácticamente desapercibidos (López *et al.*, 1999).

El cuadro clínico que más a menudo se encuentra es muy inespecífico, caracterizado por fiebre, pérdida de peso, apatía y anorexia (Parnell, 2004). El vómito también se presenta en los animales afectados (Sainz *et al.*, 2000). Alrededor del 40% de los casos presentan linfadenomegalia, a pesar que no siempre es generalizada (Sainz *et al.*, 2000). Algunos investigadores indican que la linfadenomegalia se presenta en el 20% de los casos (Neer, 2000).

Otros signos clínicos posibles incluyen hemorragias bajo la piel, dolor muscular severo de cuello y espalda, descargas por orificios nasales, tos (debido a la existencia de una neumonía intersticial), exudado inflamatorio a nivel ocular y hematuria (Sainz *et al.*, 2000).

Las hemorragias en la infección ocurren sobre todo debido a la disminución en el recuento de plaquetas sumado a una inhibición en la agregación plaquetaria debido al desarrollo de anticuerpos contra las glucoproteínas propias de las plaquetas (Sainz *et al.*, 2000).

Se presenta hepatomegalia y esplenomegalia. Se consideran signos típicos de la enfermedad los cuadros hemorrágicos, aunque éstos sólo se observan en aproximadamente el 35% de los perros con ehrlichiosis en España. De todos los signos hemorrágicos observados (petequias y equimosis en piel y mucosas, hematuria, melena, hemorragias retinianas o conjuntivales, etc.) la epistaxis es la más frecuente (Sainz *et al.*, 2000; Parnell, 2004; Neer, 2000).

Se aprecian signos neurológicos, que pueden ser ocasionados por meningitis debida a trastornos inflamatorios (meningitis linfoplasmocítica) o por hemorragias en sistema nervioso. Los signos más frecuentes son convulsiones, ataxia, estupor y síndrome de neurona motora superior o inferior, disfunción vestibular aguda central o periférica (Sainz *et al.*, 2000; Neer, 2000). En algunos casos se ha observado mórulas en células del LCR (Neer, 2000).

Alteraciones oculares se presentan en esta etapa, siendo las más comunes la uveítis anterior y afección de la retina (coriorretinitis, papiledema, hemorragia retiniana, infiltrados perivasculares en la retina y desprendimiento retiniano ampollar). La uveítis anterior que puede tener una gravedad variable, por lo general es poco intensa (Sainz *et al.*, 2000). La uveítis también se ha relacionado con la infección por *E. platys* en el perro (Neer, 2000). El edema en extremidades o escroto se observan en esta etapa de la enfermedad, pero en menor frecuencia (Woody y Hoskins, 1991).

El daño renal es evidente, además los riñones son altamente sensibles a las vasculitis inmunomediadas por el depósito de complejos inmunes en el glomérulo produciendo consecuentemente glomerulonefritis, similar a la que se presenta en la

leishmaniosis (Sainz *et al.*, 2000), la que conlleva a una insuficiencia renal aguda, presentándose signos característicos, tales como proteinuria y azotemia. Esta última debido a los niveles elevados de NUS y creatinina en la sangre (Neer, 2000).

En Brasil, las manifestaciones clínicas en etapas agudas presentaron sangrados profusos en varias regiones del Norte y Sureste del país. Estas manifestaciones clínicas sufrieron modificaciones desde la primera infección. En este país los animales que presentaron sangrados profusos agudos mostraron seroreacción a *Babesia spp.* (De Moraes *et al.*, 2004). La existencia simultánea de otras enfermedades transmitidas por garrapatas o protozoos puede alterar la presentación clínica (Parnell, 2004).

Las infecciones naturales por *E. canis* y *E. chaffeensis* pueden provocar enfermedad más grave (ehrlichiosis clásica) que *E. ewingii*. A su vez, las infecciones experimentales con *E. chaffeensis* producen sólo manifestaciones clínicas leves. De la misma forma es más probable que *E. ewingii* y *Anaplasma phagocitophilum* provoquen manifestaciones clínicas leves en los animales infectados. La poliartritis no erosiva es la lesión comúnmente encontrada en infecciones por *E. ewingii*. Finalmente, *E. risticii* puede producir enfermedad grave en caninos (Parnell, 2004).

2.6.1.2. SIGNOS CLÍNICOS EN FASE SUBCLÍNICA

Esta fase subaguda o subclínica puede durar semanas, meses o años. Esta fase no presenta signología clínica (Codner y Farris-Smith, 1986; Perille y Maltus, 1991).

Los signos de fase aguda suelen desaparecer sin tratamiento dentro de una a 4 semanas dando lugar a la fase subclínica. Los perros inmunocompetentes tienden a eliminar el agente en la etapa aguda, en caso de no eliminarlo, la enfermedad progresa a una fase crónica. No se conocen muy bien los mecanismos o factores que transforman infecciones subclínicas en un estado crónico (Greene, 1997).

2.6.1.3. SIGNOS CLÍNICOS EN FASE CRÓNICA

En los casos crónicos es posible observar signos clínicos inespecíficos, como en el trastorno agudo. Además, las tendencias hemorrágicas, la linfadenopatía, la esplenomegalia, las anormalidades oculares y las infecciones secundarias se consideran indicadores de ehrlichiosis crónica. También se han descrito poliartropatías y signos neurológicos (Greene, 1997).

La forma crónica se caracteriza por pérdida progresiva de peso, anorexia, mucosas pálidas, hemorragias de retina, mucosas y piel. La epistaxis se observa hasta en un 50% de los casos en esta fase y es considerada como distintivo de la enfermedad. También puede observarse signos neurológicos consistentes con meningoencefalitis (Beaufils, 1997).

La tendencia hemorrágica reflejada a nivel de mucosas, retina, piel abdominal o en cualquier otro órgano, es una secuela común de la infección crónica pronunciada debido al persistente número bajo de plaquetas circulantes (Ettinger, 1992). (Véase Foto N° 2 y Foto N°3)

Los cuadros hemorrágicos se observan principalmente en los Pastores Alemanes con ehrlichiosis crónica y los primeros casos se advirtieron durante la guerra de Vietnam. Los perros en la fase crónica de la infección pueden tener signos de neumonía intersticial, falla renal, desordenes reproductivos, artritis y meningoencefalitis (Ettinger, 1992).

Fotografía N° 2.- Hemorragias cutáneas puntiformes (petequias) en región costoadominal.



Fotografía N° 3.- Hemorragias cutáneas (eritema) en región inguinal.



Los animales afectados en esta fase pueden presentar cojera con marcha rígida secundaria a poliartropatía. La enfermedad articular puede ocurrir por hemartrosis o depósito de complejos inmunitarios con la consiguiente artritis y derrame neutrofílico en la articulación. Casi todos los casos de poliartritis se han relacionado con la infección por *E. ewingii* (Neer, 2000).

2.6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.6.2.1. EXAMEN HEMATOLÓGICO

En la fase aguda la principal alteración que puede observarse es la presencia de trombocitopenia a partir de 10 a 20 días post-infección (observada en el 82% de los casos afectados) (Neer, 2000; Ettinger, 1992; Greene, 1997), así como un aumento en el tiempo de coagulación por efecto de la disminución en la agregación plaquetaria debido al desarrollo de anticuerpos contra las glucoproteínas propias de las plaquetas junto a otros factores de inhibición de aglutinación, que persiste durante toda la enfermedad incluso en la fase crónica (Sainz *et al.*, 2000).

Suele observarse leucopenia (32% de los casos) seguida por leucocitosis (Ettinger, 1992) con monocitosis y/o linfocitosis (Parnell, 2004; Greene, 1997). Se ha observado linfocitosis granular en la infecciones con *E. canis.*, hallándose cuentas absolutas de linfocitos que varían entre 5200 a 17200 células/ul. y la granularidad en el citoplasma característica de leucemia linfocítica bien diferenciada (Neer, 2000).

Generalmente la anemia es no regenerativa, observándose en el 82% de los casos (Neer, 2000; Sainz *et al.*, 2000). La trombocitopenia y la anemia arregenerativa son los hallazgos hematológicos más constantes en los casos agudos y crónicos. Se observan anemias regenerativas en coinfecciones con *Babesia spp.* (Ettinger, 1992). Las anemias inmunomediadas son reportadas en la enfermedad (Parnell, 2004). Estas anormalidades rara vez se presentan en forma simultánea, son más frecuentes diversas combinaciones (Greene,

1997). Es raro observar trombocitopatía y anemias positivas a Coombs y se piensa que son, cuando menos en parte, mediadas por factores humorales (Greene, 1997).

Aunque a la ehrlichiosis canina se le denominó en el pasado pancitopenia tropical canina, tan sólo el 15-18% de los perros enfermos presentan un descenso en el recuento de las 3 líneas celulares sanguíneas (Neer, 2000; Sainz *et al.*, 2000). Esta alteración suele verse en fases crónicas de la enfermedad (Parnell, 2004).

En Brasil, la trombocitopenia es menos común que en otros países, constituyendo la evidencia de las variaciones clínicas y laboratoriales según la zona geográfica. Tal es así que en caninos de Rio de Janeiro con formas intraleucocitarias, la trombocitopenia fue un hallazgo infrecuente. En Paraná la trombocitopenia no es considerada factor de riesgo para la presencia de la enfermedad. La anemia y la linfocitosis fueron los hallazgos más frecuentes encontrados en la mayoría de pacientes afectados en Brasil (De Moraes *et al.*, 2004). La ausencia de trombocitopenia no excluye la ehrlichiosis, inclusive los signos hemorrágicos pueden ocurrir sin presencia de trombocitopenia (Parnell, 2004).

El diagnóstico de laboratorio mediante la detección de la *E. canis* en los frotis de leucocitos periféricos no es eficiente en la práctica clínica a causa de la presencia variable del microorganismo en la sangre periférica (Ettinger, 1992). La detección se logra óptimamente con frotis de capa leucocítica o examinando frotis sanguíneos delgados obtenidos de un lecho capilar periférico del borde de la oreja (Neer, 2000). Estas mórulas se observan de color azul con colorante Giemsa y de púrpura con Wright (Sainz *et al.*, 2000).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que existen otros casos que presentan comúnmente trombocitopenia, como por ejemplo, la intoxicación estrogénica producto de la aplicación de sobredosis de estrógenos en la perra con el objeto de interrumpir la gestación (Thibaut, 1989). Se debe considerar también babesiosis, distémper, hepatitis infecciosa viral canina y leptospirosis (López *et al.*, 1999).

2.6.2.2. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

La hiperproteinemia (33% de los casos), la hiperglobulinemia (39%), hipoalbuminemia (43%) y actividades de alanino aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA) (43 y 31%, respectivamente) (Greene, 2000). La hiperproteinemia resulta de valores elevados de globulina (beta y gammaglobulinas), pero no existe una correlación directa entre las concentraciones de globulinas séricas y anticuerpos séricos. La electroforesis sérica suele mostrar hiperglobulinemia policlonal, aunque ocurren gammopatías monoclonales (Neer, 2000; De Morais *et al.*, 2004).

En la fase aguda se observa un aumento en los niveles de ALT y FA evidenciando el daño inflamatorio del hígado, junto a un aumento en los niveles de bilirrubina total debido a la hemólisis intensa de algunos casos donde exista franca ictericia (Sainz *et al.*, 2000).

Los perros infectados que presentan pancitopenia suelen tener concentraciones séricas más bajas de gammaglobulina comparados con los que no son pancitopénicos (Neer, 2000).

En infecciones experimentales, después de dos semanas las proteínas alfa₂ aumentan de manera transitoria, pero disminuyen de manera gradual durante el siguiente mes hasta concentraciones menores de las normales. En infecciones experimentales crónicas, las globulinas gamma séricas aumentan de manera espectacular y disminuye la albúmina sérica. Las globulinas beta pueden aumentar de manera variable. En la etapa crónica de la enfermedad natural, los perros tienen hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia similares a las que se observan en infecciones experimentales crónicas. Después del tratamiento las gammaglobulinas pueden persistir por meses y hasta años (Greene, 1997).

La hipergammaglobulinemia proviene de la estimulación antigénica persistente y es sugestiva de una respuesta inmune inadecuada (respuesta celular pobre), que no controla la infección correctamente, ya que la producción de anticuerpos no es protectora, siendo ésta

ineficiente (Ettinger, 1992). Esta hipergammaglobulinemia suele aparecer desde la fase aguda y permanecer durante todo el curso de la enfermedad. La hipoalbuminemia está asociada a proteinuria por glomerulonefritis (Sainz *et al.*, 2000), así como también por efecto de la anorexia que lleva a una disminución en la ingesta de proteínas o por las pérdidas proteínicas en el exudado inflamatorio y por la disminución en la síntesis debido a la insuficiencia hepática presente (Neer, 2000).

Se ha demostrado que la hiperglobulinemia tiene un efecto inhibitor en la migración y adherencia de plaquetas circulantes, pudiendo provocar anemias positivas a Coombs secundarias al recubrimiento inespecífico de glóbulos rojos por globulinas (Greene, 1997).

2.6.2.3. ANÁLISIS DE ORINA

En el uroanálisis las dos alteraciones más frecuentes son la proteinuria (De Moraes *et al.*, 2004; Parnell, 2004) y la hematuria (Sainz *et al.*, 2000). La densidad específica de la orina se encuentra disminuía, así como en pacientes inmunodeprimidos es posible la aparición de infecciones secundarias con bacteriuria (Parnell, 2004).

Experimentalmente, se observa una pérdida máxima de proteínas urinarias, en especial de albúmina, 2 ½ a 3 ½ semanas después de la inoculación y se resuelve alrededor de 6 semanas después de la infección (Neer, 2000).

2.6.2.4. PRUEBAS SEROLÓGICAS

Las pruebas serológicas constituyen una base importante para el diagnóstico de la enfermedad, determinando cualitativamente o cuantitativamente niveles de anticuerpos (IgG o IgM) en los animales afectados por la ehrlichiosis canina (López *et al.*, 2003).

2.6.2.4.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFA)

El diagnóstico de ehrlichiosis suele basarse en resultados positivos a la prueba de anticuerpos fluorescentes (IFA) (Neer, 2000). Ésta fue desarrollada en 1971, siendo utilizada actualmente para el diagnóstico ehrlichial en caninos y el hombre (Greene, 1997). Esta prueba es la más habitual en el serodiagnóstico (Parnell, 2004). La IFA detecta anticuerpos tempranamente (7 días post-infección), siendo posible que algunos casos no manifiesten positividad hasta los 28 días post-infección (Neer, 2000; Parnell, 2004). Experimentalmente, se demostró que durante los 7 primeros días de la infección inicial los títulos de anticuerpos son principalmente de IgA e IgM, siendo alrededor de los 20 días post-infección mayormente un título de IgG. La mayoría de laboratorios miden este monómero en las pruebas serológicas rutinarias (Neer, 2000; Mc Bride *et al.*, 2003).

La inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) es la prueba más utilizada a nivel mundial para el diagnóstico de infecciones por *E. chaffeensis* y *E. canis*, siendo generalmente considerada como el “*Standard de Oro*” en serodiagnóstico ehrlichial. Las reacciones cruzadas debido a la homología entre los epítomos de algunas especies ehrlichiales es el inconveniente de esta prueba (Knowles *et al.*, 2003).

La proteína MAP2 es una proteína que se mantiene constante en diferentes cepas de *E. chaffeensis* y *E. canis*, por lo tanto se sospecha que tenga una función metabólica en estos microorganismos. Esta proteína se presenta comúnmente en ambas especies, ya que ésta fue detectada mediante inmunofluorescencia, de tal forma que no es útil para diferenciar ambas especies (Knowles *et al.*, 2003).

Mc Bride *et al.* (2003) trabajaron con inmunofluorescencia indirecta como prueba preliminar para utilizar proteínas recombinantes en el diagnóstico de ehrlichiosis canina por *E. canis*. De esta manera, los animales que presentaban títulos mayores o iguales a 40 eran considerados como positivos a *E. canis*.

2.6.2.4.2. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (EITB)

Esta técnica ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de diversos antígenos de importancia diagnóstica en ehrlichiosis canina. Rikihisa *et al.* (1994b), determinaron mediante esta técnica que los perros infectados experimentalmente con *E. canis*, después de 2 –3 semanas post-infección reaccionan fuertemente contra la proteína de superficie externa p30 (30 kDa.) y levemente contra las proteínas de 64, 47, 31 y 29 kDa.

La proteína de 120 kDa. de *E. chaffensis* fue identificada en *E. canis* mediante inmunoelectrotransferencia. Esta proteína fue clonada e identificada entre las proteínas de superficie externa de *E. canis*. El peso molecular de esta proteína es de 140 kDa. A su vez se propuso a esta proteína como antígeno para el serodiagnóstico (Yu *et al.*, 2000).

Posteriormente Mc. Bride *et al.* (2001) determinaron que la proteína recombinante p43 (43 kDa.) posee mayor sensibilidad que la p30 y p140 de *E. canis*, ya que de 22 muestras positivas a *E. canis* por IFA, el 100% reaccionó contra la p43. La p30 y la p140 reaccionaron ambas en un 96%. Los resultados indican que la p43 es la proteína más sensible para el diagnóstico de ehrlichiosis canina causada por *E. canis* en etapas agudas.

2.6.2.4.3. INMUNOABSORBANCIA LIGADA A ENZIMAS (ELISA)

Además de la técnica indirecta para detectar anticuerpos fluorescentes (IFA), la técnica indirecta de ELISA es muy utilizada para detectar anticuerpos contra *E. canis* (Neer, 2000). En un estudio para calcular la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en la ciudad de Yucatán (México) se trabajó con la técnica indirecta de ELISA, en el cual se indica que la prueba posee un 71% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en México *E. canis* presentó seroreacción a los 30 días post-infección, utilizando el Kit de ELISA Inmunocomb, llegando a obtener títulos desde 1:80

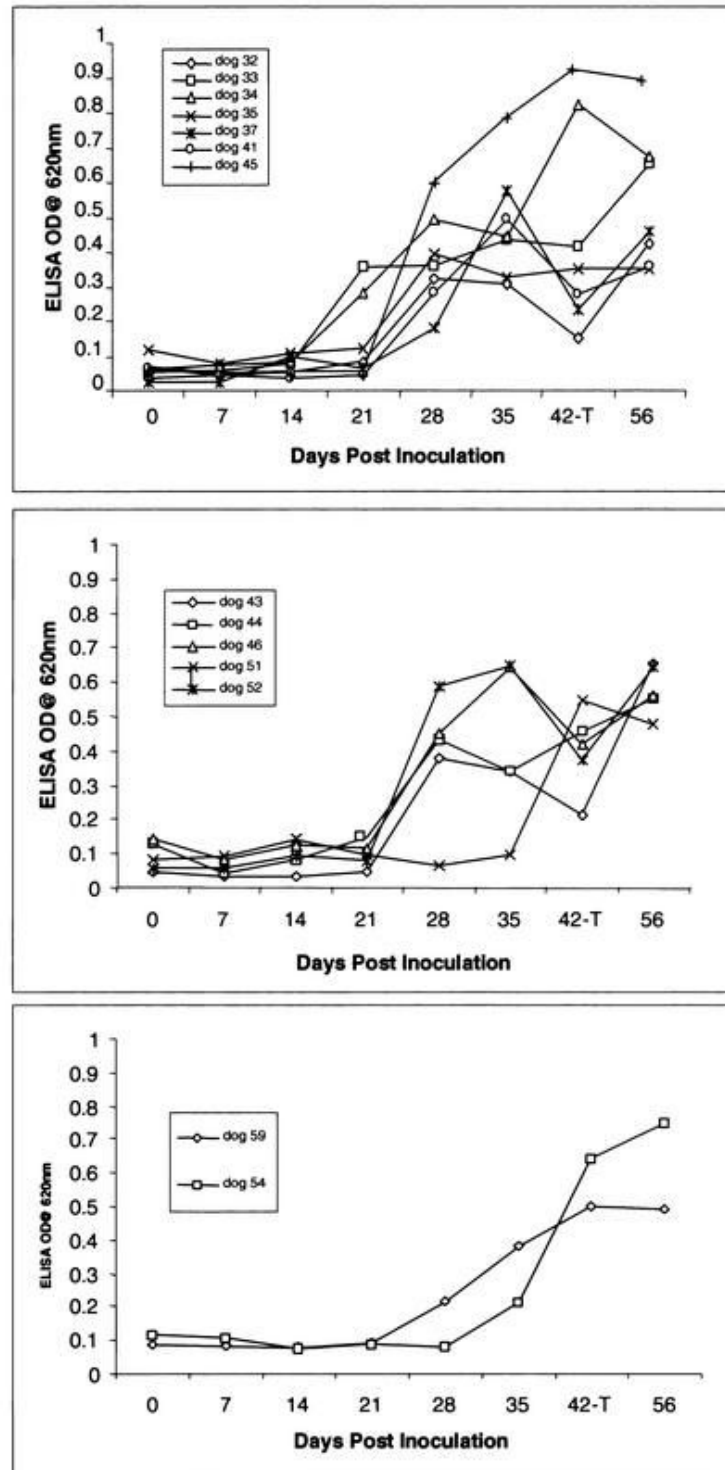
hasta 1:320 para IgG (Botelho de Castro *et al.*, 2004). El título límite para serología positiva suele establecerse de manera arbitraria y varía entre los laboratorios de 1:10 a 1:80. En consecuencia, es necesario interpretar con cautela la importancia diagnóstica de un título bajo (Greene, 1997).

La técnica indirecta de ELISA es muy práctica y de fácil realización, la cual se ha convertido en un examen rutinario para el diagnóstico de la ehrlichiosis canina. En Brasil se realizó un estudio, donde se trabajó con esta técnica, indicando que la sensibilidad de la prueba era del 80%, con 100% de especificidad. Algunos casos agudos pueden presentar signos clínicos antes de la aparición de anticuerpos circulantes. Para estos casos debe repetirse la prueba 14 a 21 días después de la primera prueba para su descarte o confirmación (De Moraes *et al.*, 2004).

Rikihisa *et al.* (1992), realizó un estudio para diferenciar infecciones por *E. canis* y *E. ewingii*. Para ello midió la respuesta de IgG contra ambas infecciones por ELISA indirecta. Se determinó que *E. canis* produce una respuesta alta de IgG en los caninos, a diferencia de la *E. ewingii*, que no indujo respuesta significativa de esta inmunoglobulina. Además, se concluyó por EITB, que los perros infectados con *E. canis* inicialmente reaccionan contra proteínas de bajo peso molecular (30, 24 y 21 kDa.) y posteriormente contra proteínas de alto peso molecular (160, 100, 78, 64, 47 y 40 kDa.). De la misma forma los perros infectados con *E. ewingii* presentaron reacciones contra proteínas de alto peso molecular únicamente, no reaccionando contra proteínas de bajo peso molecular. Estos resultados indican que ambas pruebas son de utilidad para diferenciar infecciones con *E. canis* y *E. ewingii*.

Mc. Bride *et al.* (2003), realizaron un estudio con 24 animales infectados experimentalmente, en los que detectó los antígenos expresados a diferentes días post-infección. Además, determinó que el subtipo predominante en la infección por *E. canis* es IgG2 (*Véase el Cuadro N° 1*). De esta forma se encontró que los anticuerpos inicialmente se desencadenan contra proteínas de bajo peso molecular, para luego identificar proteínas de peso molecular alto (200 kDa.)

CUADRO N° 1. Respuesta humoral (IgG2) contra *E. canis*



Tomado de : McBride *et al.* (2003). Infection and Immunity

Los títulos altos pueden permanecer durante años, como también declinar en seis a nueve meses (Neer, 2000). El tiempo de persistencia de los títulos de anticuerpos aparentemente está relacionado con el nivel de éstos durante el tratamiento de la enfermedad. Así pues, animales con títulos iniciales bajos (1:10 – 1:40) tienden a ser negativos en el transcurso de unos meses. Sin embargo, en pacientes con títulos iniciales altos (> 1:1280) es común que permanezcan elevados durante años (Greene, 1997). No se ha aclarado aún si la persistencia de anticuerpos se da por exposición continua o por persistencia de una infección previa (Greene, 1997). Títulos menores a 1:40 se consideran negativos (exposición mínima) y títulos sobre 1:80 se consideran como un infección activa (López *et al.*, 1999).

Existe reactividad cruzada entre especies ehrlichiales dependiente de los antígenos de superficie :

- *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *C. ruminantium*, tienen un complejo de antígenos mayores de superficie de 24 – 31 kDa de peso molecular.
- *E. sennetsu*, *E. risticii* y el Agente SF tienen antígenos mayores de superficie de 51 – 55 kDa.
- *Anaplasma phagocytophilum* y *A. marginale* poseen antígenos mayores de 43– 49 kDa.

No obstante, la diferencia entre grupos ehrlichiales, presentan una reacción cruzada baja. El antígeno mayor de superficie más común es el *HSP60*, y el tamaño de esta molécula varía dependiendo de la especie. Esta molécula también tiene reacción con especies del género *Rickettsia spp.* (Dumler *et al.*, 2001). Actualmente, no se dispone de una prueba serológica para *E. ewingii*, ya que esta especie no ha podido ser cultivada in vitro más allá del aislamiento en células primarias (Greene, 2000). *E. canis* y *E. sennetsu* reaccionan en forma cruzada intensa. Por otra parte, *E. risticii* presenta reacción cruzada potente con *E. sennetsu* y, en menor grado, con *E. canis*. *Ehrlichia equi* y *E. senettsu*

muestran reactividad cruzada antigénica importante y de hecho están muy relacionadas. Cabe resaltar que la reacción cruzada entre *E. canis* y otros patógenos no ehrlichiales es limitada (Greene, 1997).

El éxito en la propagación desde hace varios años de *E. canis* en líneas celulares de cultivos tisulares permite producir esta especie en cantidades bastante grandes para valoraciones serológicas tales como, la inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) y metodologías de inmunomanchas (Greene, 1997).

2.6.3. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

En caninos con EMC se han observado lesiones en diversos órganos y tejidos. Entre los hallazgos histopatológicos más frecuentes se incluye las infiltraciones de células linforeticulares y de células plasmáticas en diversos órganos y tejidos incluyendo sistema nervioso, riñones, pulmón, hígado y tejido linfoide. La infiltración celular y la proliferación linfocitaria modifican la arquitectura microscópica de los linfonódulos y del bazo (Reardon y Pierce, 1981a,b).

Recientemente, se realizó un estudio para conocer las alteraciones histopatológicas en diversos órganos utilizando 4 animales experimentalmente infectados con *E. canis*. Los hallazgos histopatológicos indicaron que todos los animales infectados presentaron cuadros hiperplásicos en los nódulos linfáticos comprometidos, tanto en la región folicular, paracortical y medular, siendo células mononucleares y plasmocitos los tipos celulares predominantes. Se observó histiocitosis, eritrofagocitosis y vasculitis mononuclear. Las lesiones esplénicas fueron hemorragias multifocales e hiperplasia linforeticular en región folicular, así como congestión de la pulpa blanca. En 2 animales se observaron cambios en el hígado, observando cuadros severos de esteatosis, infiltración perivascular y periportal de células mononucleares, así como congestión de los sinusoides hepáticos. En todos los animales infectados experimentalmente se observó glomerulonefritis crónica y vasculitis

caracterizada por infiltración de células mononucleares, así como cuadros de meningitis con infiltración de células mononucleares y presencia de gruesos agregados perivasculares de este mismo tipo celular afectando la corteza cerebral, cerebelo y médula. Finalmente trastornos similares de infiltración de células mononucleares y cuadros de vasculitis se observaron en los septos alveolares en los pulmones (Botelho de Castro *et al.*, 2004).

La infección por *E. canis* ocasiona enfermedad ocular y meningitis (Collins y Moore, 1999; Martín y Stiles, 1998). De este modo, no es frecuente que otras especies ehrlichiales que infectan al perro, ocasionen alteraciones histopatológicas a nivel ocular, pero se ha reportado la uveítis producida por *E. ewingii* (Swanson y Dubielzig, 1986). Además, se sabe que sólo existe un reporte de uveítis ocasionada por la infección con *A. platys* (Glaze y Gaunt, 1986).

En un estudio realizado con 27 perros infectados con *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *Anaplasma phagocytophilum* se determinó cual de las especies mencionadas producían alteraciones histopatológicas a nivel ocular y nervioso, de que intensidad y de que tipo eran estas alteraciones y a que lesiones correspondían. Se determinó que sólo los perros con infección por *E. canis* (14) sufrieron alteraciones histopatológicas oculares y nerviosas. Los cambios se encontraron en cuerpo ciliar, iris, coroides, retina y meninges; encontrándose un infiltrado predominantemente linfocítico, monocítico y plasmocitario. La necropsia en los animales fue realizada desde 22 hasta 200 días post-infección, notando un incremento en la relación linfocitaria respecto al tiempo post-infección. Estos resultados evidencian que los cambios a nivel ocular y nervioso son probablemente debido a la llegada de partículas antigénicas, provocándose la formación de complejos inmunes, atrayendo gran cantidad de células mononucleares (células plasmáticas, macrófagos y linfocitos) (Panciera *et al.*, 2001).

2.6.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La detección específica de *E. canis*, así como de otras especies ehrlichiales realizada mediante técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) representa un método de mayor sensibilidad que el serológico y/o el cultivo celular, siendo necesario un entrenamiento adecuado y equipos especializados (Gusa *et al.*, 2001).

De esta manera, Mc Bride *et al.* (1999) determinaron que la proteína p30 de *E. canis* era codificada por una familia de genes múltiples, que codificaban diversas subunidades de proteínas p30 (con pesos moleculares similares). Para esto, ya se había descubierto un sistema análogo en las especies *E. chaffeensis*, *A. marginale* y *C. ruminantium*. Se propuso en este estudio la importancia diagnóstica, así como protectiva de esta proteína para la ehrlichiosis canina.

En humanos se conoce que las proteínas de superficie *rOmpA* y *rOmpB* determinan las inmunoreacciones en las enfermedades del género *Rickettsia spp.*, las cuales son muy importantes debido a que son de utilidad diagnóstica para las enfermedades ocasionadas por este género. Estas especies son genéticamente similares a las del género *Ehrlichia spp.*, pero con la diferencia que las primeras destruyen células endoteliales directamente, ocasionando las típicas manchas rojizas de tamaño variable sobre la piel, así como en órganos internos (Zavala *et al.*, 2004).

El uso de proteínas recombinantes actualmente es de gran utilidad, ya que es un método sumamente específico que permite diferenciar especies ehrlichiales. La producción de una gran cantidad de proteínas recombinadas, producidas en *E. coli* principalmente constituye la técnica base para los trabajos de investigación enfocados al diagnóstico molecular desde hace algunos años (Knowles *et al.*, 2003).

Las reacciones cruzadas entre *E. canis* y *E. chaffeensis* se deben a los pesos moleculares similares entre las proteínas de membrana externa de ambas especies (28 – 30 kDa.), siendo éstas codificadas por una familia multigénica de genes homólogos. Esta

familia multigénica *p28*, está compuesta por 21 subunidades génicas para *E. chaffeensis*, mientras que para *E. canis* está conformada por un número similar. Esto explica las reacciones serológicas cruzadas entre *E. canis* y *E. chaffeensis*, ocurriendo lo mismo entre cepas de una misma especie (Unver *et al.*, 2001b)

La familia multigénica *p28* de *E. canis* no varía mucho entre cepas de diversas zonas geográficas norteamericanas, siendo de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad (Mc Bride *et al.*, 1999; Mc Bride *et al.*, 2000). A diferencia de lo que ocurre con la familia *p28* de *E. chaffeensis*, la cual no es muy útil para diagnosticar esta especie debido a que no mantiene esa uniformidad geográfica (Yu *et al.*, 2000). Esto se atribuye principalmente a la variabilidad de esta familia entre cepas de *E. chaffeensis* (Yu *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la *p28* se presenta también en *E. ewingii* y *E. muris*, demostrando de esta forma que las especies del genogrupo I poseen un grupo de antígenos con pesos moleculares similares 30 kDa (Mc Bride *et al.*, 1999). La proteína recombinante rp140 no es utilizada para diagnosticar infecciones causadas por *E. canis*, ya que se ha demostrado que en animales IFA-negativos esta proteína es detectada. Esto puede explicarse debido a una reacción cruzada con antígenos propios del mismo peso molecular (Mc Bride *et al.*, 2001).

El gen *p43*, que codifica una proteína de 42,6 kDa recientemente ha sido detectado en animales infectados con *E. canis* en el 100% de los casos evaluados, no siendo detectado en el genoma de *E. chaffeensis*. Además, anticuerpos monoclonales reactivos contra la proteína *p43* no son efectivos frente a *E. chaffeensis*. La proteína *p43* representa una herramienta fundamental para el diagnóstico molecular de *E. canis* tanto en humanos como en caninos, ya que ésta no se presenta en *E. chaffeensis* y ambas son especies que serológicamente presentan reacción cruzada por similitud antigénica (Mc Bride *et al.*, 2001).

La proteína recombinante *rMAP2* de *E. canis* y de *E. chaffeensis* ha sido recientemente evaluada, para determinar su habilidad diagnóstica. Se ha demostrado que se presenta tanto en caninos como en humanos infectados a diferencia de caninos y humanos

libres de ambos microorganismos (Alleman *et al.*, 2000; Alleman *et al.*, 2001). Esta proteína rMAP2, reacciona con *E. chaffeensis* y *E. canis*, siendo de utilidad para diagnosticar la presencia de ambas, pero no para diferenciarlas serológicamente (Knowles *et al.*, 2003). Esta proteína no presentó reacción cruzada (mediante ELISA) en suero de perros infectados con *Anaplasma platys*, *Ehrlichia ewingii*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii*, *Bartonella vinsoni*, *Mycoplasma haemocanis*, y *Neospora caninum* (Alleman *et al.*, 2001).

2.6.5. INMUNIZACIÓN

Sobre la membrana externa de los organismos ehrlichiales existen diferentes proteínas que actúan como antígenos, estas moléculas ocasionan los diversos trastornos en los hospederos susceptibles a ellos. Esta gran cantidad de proteínas de diversos pesos moleculares han sido investigadas desde hace varios años para el diagnóstico de la enfermedad, detectando cual o cuales proteínas están involucradas realmente en la infección (Unver *et al.*, 2001a).

Las proteínas de membrana externa (OMP) de 30 kDa., son un grupo de antígenos inmunodominantes de *E. canis*, los cuales presentan una reacción cruzada muy fuerte con los antígenos de 28 kDa. (OMP-1s) de *E. chaffeensis*, por EITB de sueros de animales experimental y naturalmente infectados (Ohashi *et al.*, 1998a; Rikihisa *et al.*, 1994b).

Se sabe que *E. canis* y *E. chaffeensis* son muy similares por la homología del gen *ARNr 16S* (Anderson *et al.*, 1991). Las proteínas p30 y OMP-1s son codificadas por una familia multigénica polimórfica y la inmunización de ratones con OMP-1 recombinante protegió a los ratones de la infección ehrlichial (Ohashi *et al.*, 1998a; Ohashi *et al.*, 1998b).

Recientes estudios revelaron que esta familia de proteínas p30 de *E. canis* estaba constituida por 22 genes polimórficos, los cuales son similares entre si, pero no idénticos. Todos los genes de la familia p30 se han expresado en células DH82 (línea celular de

monocitos caninos) y analizados con RT-PCR (Ohashi *et al.*, 2001). Actualmente ya se ha determinado la expresión de estos 22 genes polimórficos que conforman la familia de p30 en *E. canis*. Se infectaron experimentalmente garrapatas (adultos, hembras y ninfas), perros y monocitos DH82 (cultivo celular), buscando evaluar la expresión de estos genes en estos ambientes, así como la expresión de estos en el cultivo celular a temperaturas de 25° y 37°C. Los resultados indicaron que las garrapatas expresaron predominantemente el gen *p30-10* y en perros se expresaron otros genes de la familia p30, pero no la *p30-10*. Además se determinó que la temperatura óptima para la expresión génica en cultivo celular (monocitos DH82) era de 25°C (Unver *et al.*, 2001b).

La variación antigénica es un problema que complica la fabricación de vacunas a nivel mundial, debido a que los microorganismos patógenos modifican su estructura y el sistema ya no reconoce al patógeno. El gen *p30-10* es el único que se expresa en garrapatas experimentalmente infectadas. Ésta es expresada en las glándulas salivales e intestino de las garrapatas adultas (machos y hembras) y ninfas. Los genes que se expresan en el perro son diferentes a los vistos en los artrópodos y se asocian con el cuadro severo en este hospedero (Unver *et al.*, 2001b).

El gen *p30-10* ha sido detectado en garrapatas naturalmente infectadas, desechando la posibilidad que la expresión de este gen en el laboratorio no se de naturalmente. Inclusive ha sido detectado en garrapatas de diversas zonas geográficas de los Estados Unidos, de tal forma que actualmente se están realizando trabajos en el cual esta proteína es propuesta como antígeno para la elaboración de vacunas utilizando la tecnología recombinante (Felek *et al.*, 2003).

Borrelia burgdorferi, realiza un sistema de evasión del sistema inmune al alternar sus antígenos tanto en garrapatas como en mamíferos (Schwan *et al.*, 1995). La proteína *OspA* se expresa en cantidades altas en intestino de garrapatas infectadas. Recientemente se ha fabricado una vacuna recombinante (Recombitek Lyme), la cual previene la transmisión de esta bacteria hacia los mamíferos por neutralización de esta proteína en el intestino de la garrapata después de ingerir la sangre de un animal vacunado, (Pal *et al.*, 2001) es decir con

anticuerpos específicos contra esta proteína. Se especula que en el futuro, por analogía al sistema aplicado en *B. Burdorgferi*, la *p30-10* pueda ser utilizada como candidata para la elaboración de vacunas contra la ehrlichiosis transmitida por *E. canis* (Felek *et al.*, 2003).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. LUGAR Y ÉPOCA DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Los animales considerados, así como las muestras de sangre llegadas al Laboratorio de Patología Clínica provinieron de la Clínica de Animales Menores de la FMV – UNMSM., así como de otros centros veterinarios de Lima.

Se recopiló la información obtenida de casos desde Noviembre del 2002 hasta junio del 2004. Se consideraron los casos hasta el mes de Junio, ya que en promedio a partir de este mes disminuye la presentación clínica de la enfermedad.

3.2. MATERIALES

3.2.1. ANIMALES

Para el estudio se consideraron 77 perros con signos compatibles con ehrlichiosis canina, sin tener en cuenta la fase clínica (aguda y/o crónica) en curso, raza, sexo, edad y/o procedencia. Así también se contó con 20 animales control aparentemente normales.

3.2.2. MATERIALES

Para el procesamiento hematológico de las muestras se utilizaron materiales del Laboratorio de Patología Clínica de la FMV-UNMSM. Mientras que para la detección de anticuerpos se contó con kits de ELISA indirecta, que detectan anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Borrelia burgdorferi*, así como antígeno secretorio-excretorio de hembras de *Dirofilaria immitis*.

Los materiales utilizados para hematología fueron clasificados de la siguiente manera :

Equipos :

- Microscopio de inmersión con luz artificial (10X, 40X, 100X)
- Espectrofotómetro UV (Photometro 4010 Manheim Boehringer)
- Centrífuga para microcapilares
- Agitador para pipetas
- Contadores manuales
- Contador celular (Diferenciación celular)
- Micropipeta (1000 ul)

Material de vidrio :

- Pipetas de Thoma para glóbulos blancos
- Pipetas de Thoma para glóbulos rojos
- Pipetas de Shalli para determinación de hemoglobina
- Cámaras de Neubauer
- Microcapilares sin anticoagulante

Tubos de prueba
Láminas portaobjetos

Reactivos :

Colorante Wright
Reactivo de Drabkin
Dilutor para conteo de glóbulos blancos
Dilutor para conteo de glóbulos rojos
Solución Buffer para tinción Wright

Otros :

Aceite de inmersión
Agua destilada
Cronómetro
Mechero de Bunsen
Agujas 21 x 1 mm.
Frascos con anticoagulante (EDTA)
Mangueras de goma
Calculadora
Balón de gas
Algodón
Secadora
Gradillas para tubos

3.3. MÉTODOS

3.3.1. OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN DEL PACIENTE

La información de los pacientes de la Clínica de Animales Menores fue remitida en la ficha de solicitud para pruebas de laboratorio. En ella se adjuntaba los datos de

anamnesis y examen clínico. En los casos en la que la información fuese incompleta, inmediatamente se solicitaba al propietario del animal la información adicional.

Con respecto a los casos que provenían de otros Centros veterinarios, si la información remitida no era suficiente, se consultaba directamente con el propietario del animal en el laboratorio o por vía telefónica al médico veterinario encargado del caso en cuestión.

La información básica necesaria por paciente para el presente estudio consistió en:

- Examen clínico completo
- Edad
- Raza
- Antecedentes de garrapatas
- Zona o procedencia
- Rol vacunal

3.3.2. TOMA DE MUESTRA

Los pacientes de otros centros veterinarios solicitaban la toma de muestra en el Laboratorio de Patología Clínica. En estos casos, la muestra era obtenida de la vena cefálica (1 – 2 ml.) del miembro anterior como primera opción, pero en animales difíciles de manejar era obtenida de la vena safena (miembro posterior). Se utilizaron jeringas de 3, 5, 10 cc. con agujas estériles de 21x 1 ó 21 x 1 ½ descartables y la muestra era colocada en frascos esterilizados con EDTA (ácido etilendiamino tetraacético).

La toma de muestra de los pacientes provenientes de la Clínica de Animales Menores fue realizada en dicha clínica, de tal manera que se remitían al Laboratorio de Patología Clínica las muestras de sangre, así como las fichas de los animales indicando la

información mencionada anteriormente. Las muestras remitidas con presencia de coágulos eran devueltas para una nueva toma de la misma.

3.3.3. EXAMEN HEMATOLÓGICO

El examen hematológico fue realizado basándose en las técnicas descritas en el Manual de Patología Clínica publicado por Benjamín (1991).

3.3.3.1. DETERMINACIÓN DEL HEMATOCRITO (*Ht*)

El examen hematológico se inició con el cálculo del hematocrito (*Ht*), para ello se llenó un microcapilar con la muestra correctamente homogenizada. Seguidamente se colocó una gota de sangre del microcapilar en un extremo de una lámina portaobjetos, para realizar el frotis sanguíneo.

El microcapilar se selló por el extremo libre a fuego de mechero (evitando que éste quemara la muestra) y colocado en la centrífuga para microcapilares a 10,000 rpm. por 5 minutos. Una vez culminado el tiempo se calculó el paquete celular (VPC o *Ht*. expresado en porcentaje) con ayuda de una tarjeta para microcapilares graduada del 0 a 100. La coloración del plasma fue necesaria tenerla en cuenta si existía sospecha de hemólisis, ictericia o lipemia.

3.3.3.2. RECuento DE GLÓBULOS BLANCOS Y ROJOS

El recuento de glóbulos blancos y rojos se realizó utilizando las pipetas de Thoma respectivas para cada cuenta. Las que se utilizaron para glóbulos blancos tienen la medida hasta 11 ul., mientras que las que se emplean para glóbulos rojos llegan hasta 101 ul. El procedimiento se inició con la correcta homogenización de la muestra y la adaptación de

una manguera de goma al extremo posterior de la pipeta. Con una aspiración suave se llenó la misma con la muestra hasta 0.5 ul. En caso de pasar la marca, con ayuda de un algodón se eliminó el sobrante haciendo ligeros toques del mismo con la punta de la pipeta. Luego se procedió a llenar la pipeta hasta la marca de 11 ul. (glóbulos blancos) o 101 ul. (glóbulos rojos) con el dilutor respectivo para cada caso. La sustancia dilutora para glóbulos rojos fue isotónica (no lisante) y para glóbulos blancos fue hipertónica (lisante).

Una vez llenadas las pipetas se colocaron ambas en el agitador para homogenizar la mezcla en cada pipeta. Ya homogenizadas se eliminaron las 2 ó 3 primeras gotas y se procede al llenado de la cámara de Neubauer. La técnica de contaje se indica con detalle en el Manual de Patología Clínica de Benjamín (1991).

3.3.3.3. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA (*Hb*)

La determinación de hemoglobina en sangre se realizó mediante el método de la cianometahemoglobina. El procedimiento se inició con el llenado de 5 ml. del Reactivo de Drabkin en un tubo de prueba. Luego de homogenizar la muestra se llenó la pipeta de Shali (con ayuda de una manguera de goma en el extremo posterior) hasta la marca de 20 ul. Finalmente, éstos se depositaron en el fondo del tubo con Drabkin y se homogenizaron ambas partes con ayuda de la misma pipeta soplando al interior del tubo. El tiempo de reacción fue de 10 minutos, para luego realizar la lectura de la muestra en el espectrofotómetro. La lectura se realizó con una longitud de onda de 546, factor 37.00 y utilizando la opción CF (factor). El espectrofotómetro fue llevado a cero con 1 ml. de Drabkin y posteriormente se realizó la lectura con 1 ml. de la muestra, pulsando 2 veces la tecla de resultado, el cual fue expresado en g/dl.

3.3.3.4. RECuento DIFERENCIAL

El frotis se realizó sobre la lámina que tenía la gota de sangre en uno de los extremos, colocando una segunda lámina en un ángulo de 45° con relación a la anterior. La gota al entrar en contacto con el borde de la lámina en ángulo fue desplazada a ambos lados del borde y finalmente se realizó el arrastre debiendo ser éste suave y firme. Concluido el procedimiento se marcó la lámina con ayuda de un lápiz convencional sobre el frotis.

La lámina con el frotis fue teñida con el colorante Wright. El colorante debió permanecer 3 minutos, para luego adicionar de 10 a 12 gotas de solución buffer sobre la lámina y con ayuda de una manguera de goma homogenizar el buffer con el colorante. Una vez realizado este procedimiento se aguardó 5 minutos para finalmente lavar la lámina con agua a discreción. La lámina coloreada se dejó secar para su posterior análisis.

El análisis del frotis sanguíneo es el último paso del examen hematológico. Se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la lámina teñida y se observó a objetivo de inmersión (100X). Aquí se realizó la diferenciación celular con ayuda de un contador celular. El procedimiento más sencillo consistió en iniciar la diferenciación en la zona de mayor grosor e ir avanzando horizontalmente hacia el extremo menos grueso, para que ésta sea representativa. El objetivo era llegar a diferenciar 100 células en el contador, de tal forma que cada línea celular tenía un porcentaje determinado (valor relativo). Posteriormente se procedió a obtener la cantidad exacta de células (valor absoluto) al calcular la cantidad de células tomando el valor relativo con respecto a la cuenta total de glóbulos blancos, ya que las células diferenciadas pertenecen a la serie blanca. Los rangos normales circulantes en sangre periférica (valores relativos y absolutos) de cada grupo celular (segmentados, linfocitos, monocitos, etc.) fueron tomados de Benjamín (1991). Finalmente se realizó la interpretación de los valores absolutos para cada grupo celular.

El cálculo del número de plaquetas se realizó contando la cantidad total de plaquetas encontradas en 10 campos de 100X (objetivo de inmersión). Posteriormente se obtuvo un

promedio de los campos evaluados y ese valor fue multiplicado por 15,000 (factor). El resultado se expresa en :

NÚMERO DE PLAQUETAS / microlitro (ul.)

En el frotis se realizó la búsqueda de inclusiones intracitoplasmáticas en las células blancas. Éstas se evidenciaron en pocos casos pero la visualización de las mismas fue distintiva de la enfermedad. La evaluación del frotis nos proporcionó otros datos, tales como la presencia de pilas globulares o formación de Roleaux, cambios en la morfología celular normal, presencia de glóbulos rojos nucleados, evidencia de hemólisis intravascular, aglutinación de glóbulos rojos, entre otros.

El objetivo del examen hematológico fue detectar la presencia de las alteraciones hematológicas típicas de la enfermedad. Neer (2000) presentó el siguiente orden, basándose en las frecuencias de las mismas en múltiples casos de ehrlichiosis canina, teniendo como alteración más importante y frecuente a la trombocitopenia :

- 1) Trombocitopenia,
- 2) Anemia,
- 3) Leucopenia, y
- 4) Pancitopenia.

Los animales no trombocitopénicos, pudiendo presentar otras citopenias (anemia y/o leucopenia), fueron tomados como casos negativos al examen hematológico para ehrlichiosis canina, debido a que no presentaron la alteración patrón. Los animales pancitopénicos fueron considerados como positivos al examen hematológico.

3.3.4. PRUEBA SEROLÓGICA

La técnica indirecta de ELISA fue realizada utilizando una prueba comercial que posee un 99% de sensibilidad y 100% de especificidad. Estos valores fueron obtenidos al analizar una población de 244 animales, contrastando la prueba indirecta de ELISA con IFA (inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos) para *E. canis*. Así también se obtuvo el grado de concordancia, mediante el estadístico de Kappa, hallándose un 99% de concordancia entre ambas pruebas. (Laboratorios IDEXX, 2002)

La prueba comercial esta compuesta por :

- Dispositivo de prueba :
 - Solución de lavado
 - Solución de sustrato
- Frasco (conjugado) de Anti-HTWM / *B. burgdorferi* / *E. canis* HRPO
- Pipeta de transferencia
- Tubo de muestra (tapa azul).
- Muestra : Suero, plasma y sangre entera.

El procedimiento se inició con la homogenización adecuada de la muestra. Con la pipeta de transferencia se extrajo 3 gotas de la misma, las cuales fueron depositadas en el tubo de muestra. Seguidamente, se colocaron 4 gotas del conjugado en el mismo tubo y se cerró herméticamente. Se homogenizó la mezcla con 3 a 4 inversiones del tubo y luego el contenido fue vertido a la cubeta de muestra del dispositivo de prueba. Finalmente, la mezcla fue filtrada lentamente por la membrana del dispositivo y cuando ésta llegó al círculo de activación, se pulsó firmemente el activador del mismo, dándose inicio a la fase de lavado de la prueba. La lectura se realizó en 8 minutos. La interpretación de los resultados, así como la esquematización del método se indican en el Apéndice N° 5.

NOTA : Fueron considerados como animales positivos a ehrlichiosis canina, aquellos que manifestaron seropositividad a anticuerpos contra *E. canis*. Los animales

seronegativos pero positivos al examen hematológico (trombocitopénicos), fueron considerados como sospechosos a la enfermedad y los resultados analizados posteriormente.

3.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados del examen hematológico y la prueba indirecta de ELISA obtenidos de los 97 animales (77 casos y 20 controles) en el presente estudio, fueron analizados estadísticamente para determinar el *Grado de concordancia* entre ambas pruebas mediante el método estadístico de *Kappa* (Cohen, 1960).

$$Kappa = \frac{f_o - f_c}{N - f_c}$$

Donde :

f_o = Frecuencias concordantes observadas

f_c = Frecuencias concordantes esperadas

N = Total de frecuencias observadas

El intervalo de confianza para el estadístico de *Kappa* fue calculado con la siguiente fórmula :

$$I. C. 95\% = Kappa \pm 1.96 (Error Estándar)$$

El *Error Estándar* se calcula mediante la siguiente fórmula :

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{f_o (N - f_o)}{N (N - f_c)^2}}$$

Así también, se trabajó con el método estadístico de χ^2 para determinar si existe asociación (significancia estadística) entre las variables edad, raza, sexo, presencia de trombocitopenia, presencia de leucopenia, presencia de anemia y antecedentes de garrapatas en los casos evaluados, respecto a la presencia de la enfermedad. De la misma forma se determinó si existe relación entre las diversas razas evaluadas y las evidencias clínicas hemorrágicas (debido a la susceptibilidad racial del Pastor alemán a padecer cuadros hemorrágicos).

Finalmente, se analizaron las frecuencias encontradas respecto a la presentación de cuadros citopénicos (asociaciones citopénicas más frecuentes), así como las frecuencias halladas respecto a los signos clínicos en los animales evaluados. Estos datos son de suma importancia diagnóstica a nivel hematológico, así como a nivel clínico para una mejor detección de los pacientes con ehrlichiosis canina en nuestro medio.

IV. RESULTADOS

4.1. GRADO DE CONCORDANCIA

El grado de concordancia encontrado entre el examen hematológico y la prueba indirecta de ELISA, según el método estadístico de *Kappa* para variables cualitativas binarias fue de 84.67% +/- 10.98%.

4.2. SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA ENTRE VARIABLES DE ESTUDIO

Se evaluó la asociación de las variables sexo, edad, raza, presencia de trombocitopenia, leucopenia, presencia de anemia y antecedentes de garrapatas, con la presencia de la enfermedad. Se observó significancia estadística a la prueba de chi-cuadrado ($P < 0.05$), para las variables trombocitopenia, leucopenia, anemia y antecedentes de garrapatas, no hallándose asociación de la enfermedad con el sexo, edad y raza de los animales. Los valores detallados se indican en el (Cuadro N° 2).

El análisis de las razas respecto a la presentación clínica de signos hemorrágicos indicó que a la prueba de chi-cuadrado no es estadísticamente significativa la relación entre

los Pastores alemanes y las demás razas a padecer cuadros hemorrágicos. A diferencia de las razas nórdicas (Siberian Husky y Samoyedo) que fueron estadísticamente significantes a la prueba de chi-cuadrado respecto a las demás razas a padecer cuadros hemorrágicos. (Véase el Cuadro N° 3)

4.3. FRECUENCIAS CITOPÉNICAS Y SIGNOLÓGICAS

De los 39 animales que manifestaron pancitopenia, se encontró que el 94.87% +/- 6.92% de ellos, fueron positivos a ehrlichiosis canina. Así también, de los 16 casos con trombocitopenia y anemia (bicitopenia), el 93.75% +/- 11.86% resultaron ser positivos a la enfermedad. (Véase el Cuadro N° 4)

Se determinó que del total de animales únicamente anémicos (9) el 88.88% +/- 20.54% fueron negativos a la enfermedad. Y el 100% de los animales que no presentaron citopenia alguna, así como anemia y leucopenia (bicitopenia) fueron encontrados negativos a ehrlichiosis canina. (Véase el Cuadro N° 4)

Dentro de los signos clínicos encontrados, el 100% de los casos que evidenciaron epistaxis fueron positivos a ehrlichiosis canina. De los animales que presentaron lesiones equimóticas (13), el 92.30% +/- 14.49% fueron animales positivos a la enfermedad. (Véase el Cuadro N° 5)

CUADRO N° 2.- Análisis estadístico e *I.C.* del sexo, edad, raza, trombocitopenia, leucopenia, anemia y antecedente de garrapatas en los 77 casos seropositivos a *Ehrlichia canis* (2002 – 2004) ^a

<i>Sexo</i>	<i>n</i>	Positivo	%	IC ^b
Macho	59	43	72.88	11.34
Hembra	18	15	83.33	17.22

<i>Edad</i>				
< 2 años	20	13	65	20.90
2 - 4 años	31	25	80.64	13.91
> 4 años	26	20	76.92	16.20

<i>Raza</i>				
Pastor Alemán	15	13	86.66	17.20
Otras Razas	62	45	72.58	11.10

<i>Trombocitopenia ^c</i>				
No	14	1	7.14	13.49
Si	63	57	90.47	7.25

<i>Leucopenia ^c</i>				
No	32	18	56.25	17.19
Si	45	40	88.88	9.19

<i>Anemia ^c</i>				
No	10	3	30	28.40
Si	67	55	82.09	9.18

<i>Antecedente de Garrapatas ^c</i>				
No	22	20	90.9	12.01
Si	55	38	69.09	12.21

^a Laboratorio de Patología Clínica – FMV – UNMSM.

^b Con 95% de I.C. y 0.05 de nivel de significancia

^c P < 0.05

CUADRO N° 3.- Análisis estadístico e *I.C.* de las razas Pastor Alemán y Nórdicas (Siberian-Husky y Samoyedo) frente a las demás razas respecto a los signos hemorrágicos en los casos seropositivos a *Ehrlichia canis* (2002 – 2004). ^a

Razas	<i>n</i>	Sangrados	%	I.C. ^b
Pastor Alemán	13	8	61.54	26.45
Otras razas	45	22	48.88	14.61

Nórdicos ^c	6	6	100	
Otras razas	52	24	46.15	13.55

(a) Laboratorio de Patología Clínica – FMV – UNMSM.

(b) con 95% de IC y 0.05 de nivel de significancia

(c) $P < 0.05$

CUADRO N° 4.- Frecuencias e *I.C.* de las citopenias encontradas en los 77 casos compatibles con ehrlichiosis canina frente a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* (2002 – 2004). ^a

CITOPENIA	Resultados de ELISA indirecta				I.C. ^b	Total
	Positivos	%	Negativos	%		
Pancitopenia	37	94.87	2	5.13	6.92	39
Trombocitopenia y anemia	15	93.75	1	6.25	11.86	16
Trombocitopenia y leucopenia	3	60	2	40	42.94	5
Trombocitopenia	2	66.66	1	33.34	53.21	3
Anemia	1	11.12	8	88.88	20.54	9
Anemia y leucopenia	0	0	1	100	0	1
No citopénicos	0	0	4	100	0	4

(a) Laboratorio de Patología Clínica – FMV – UNMSM..

(b) Con 95 % de I.C. y 0.05 de nivel de significancia.

CUADRO N° 5.- Frecuencias e *I.C.* de signos clínicos encontrados en los 77 casos compatibles con ehrlichiosis canina frente a la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* (2002 – 2004). ^a

	Positivos	%	Negativos	%	I.C. ^b	TOTAL
Epistaxis	11	100	0	0		11
Equimosis	12	92.30	1	7.70	14.49	13
Postración	9	81.81	2	18.19	25.66	11
Linfadenomegalia	4	80	1	20	35.06	5
Petequias	11	78.57	3	21.43	21.33	14
Pérdida de peso	18	78.26	5	21.74	16.93	23
Mucosas pálidas	13	76.47	4	23.53	20.30	17
Melena	3	75	1	25	42.44	4
Fiebre	30	73.17	11	26.83	13.59	41
Depresión	36	70.59	15	29.41	12.45	51
Vómitos	5	71.43	2	28.57	33.62	7
Anorexia	31	68.88	14	31.12	13.51	45

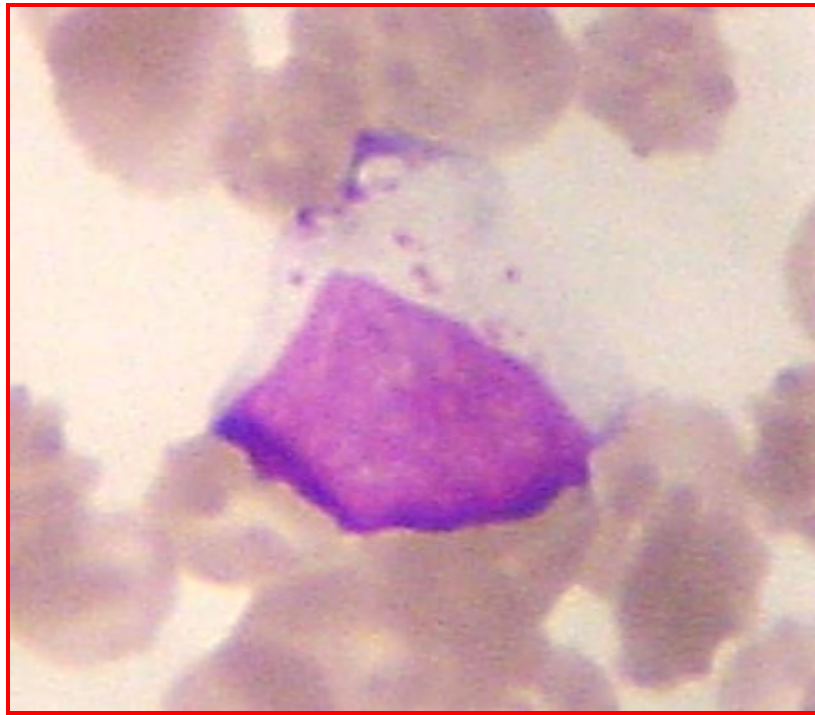
^a Laboratorio de Patología Clínica – FMV – UNMSM.

^b con 95% de I.C. y 0.05 de nivel de significancia

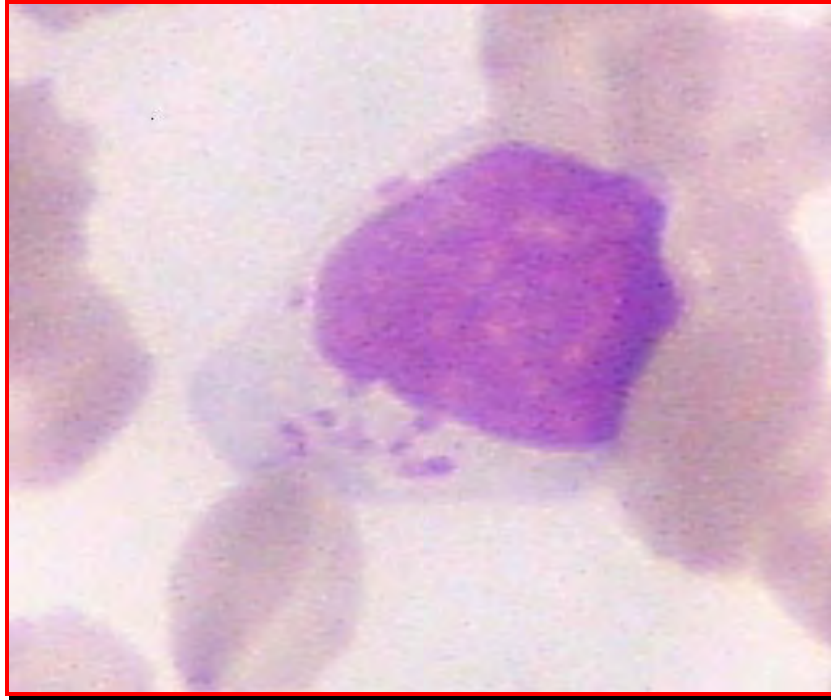
Fotografía N° 4. Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formas densas)



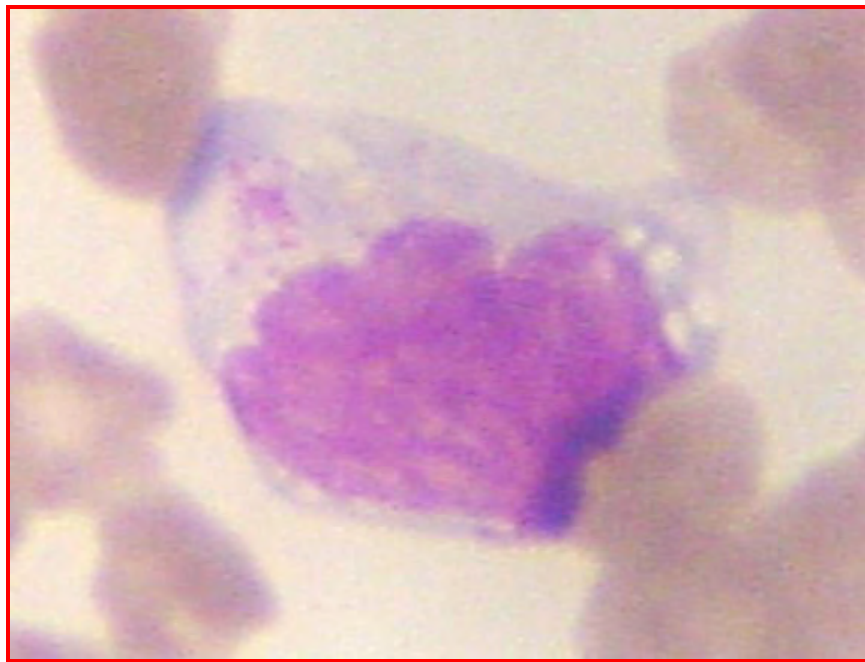
Fotografía N° 5. Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formas densas y ligeras I)



Fotografía N° 6. Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formas densas y ligeras II)



Fotografía N° 7. Linfocito infectado con *Ehrlichia canis* (Formación morular)



V. DISCUSIÓN

En el presente estudio el análisis estadístico de *Kappa* indicó una concordancia de 84.67% +/- 10.98 entre los resultados del examen hematológico y la prueba indirecta de ELISA, considerado como “MUY BUENO”. Esto indica que ambas pruebas presentan una similitud considerable para el diagnóstico de la ehrlichiosis canina, de tal forma que para los casos con sintomatología clínica compatible y/o antecedentes de garrapatas, el examen hematológico sería de gran utilidad en el diagnóstico. Pero en los casos donde los resultados hematológicos sean confusos (sin) en presencia o no de sintomatología clínica compatible y/o antecedentes de garrapatas, la técnica indirecta de ELISA sería el método a elegir para confirmar la presencia de la enfermedad. Estos resultados no excluyen la utilización de una u otra prueba para la detección de ehrlichiosis canina, pero los casos que presentan signos clínicos y resultados hematológicos compatibles con ehrlichiosis canina (trombocitopenia y/o otras citopenias) es muy probable que padezcan la enfermedad en nuestro medio. Los resultados serológicos negativos y a la vez positivos al examen hematológico, probablemente se deban a otras patologías que ocasionen esta alteración, tal como la infección por *Leptospira spp.*, *Babesia spp.* (Ettinger, 1992), u otra especie ehrlichial que no sea detectada mediante la prueba comercial. Cabe resaltar que la prueba indirecta de ELISA identifica anticuerpos (IgG) específicos contra proteínas de superficie externa (*Omp*) de *Ehrlichia canis*, pudiendo hacer reacción cruzada con *Ehrlichia*

chaffensis y *Ehrlichia ewingii* que pertenecen al mismo genogrupo (Dumler *et al.*, 2001). Se han reportado casos de reacción cruzada con especies de otros genogrupos (*Anaplasma phagocytophilum* y *Neorickettsia helminthoeca*) pero en otras zonas geográficas (Greene, 1997; Neer, 2000). Recientemente, se ha demostrado el fenómeno de variación antigénica en la especie *E. canis* en Sudamérica (Felek *et al.*, 2003), ya que en Venezuela se detectó una especie ehrlichial 99.9% similar a *E. canis*, denominándola como agente de la ehrlichiosis humana venezolana (AEHV) siendo este el causante de la enfermedad en un caso humano en dicho país (Unver *et al.*, 2001a). Este hallazgo puede explicar los 2 casos pancitopénicos, así como el caso bicitopénico (trombocitopenia y anemia) con serología negativa para *E. canis*. Estas muestras han sido conservadas para posteriormente, realizar estudios a nivel molecular de secuenciación y/o búsqueda de genes específicos de otras especies ehrlichiales mediante técnicas de PCR.

No se encontró significancia estadística ($P < 0.05$) entre las variables sexo, edad y raza frente a la presencia de la enfermedad. Respecto a la edad, estudios anteriores indican que no existe asociación entre la edad y la presencia de la enfermedad (Matthewman *et al.*, 1993). En contraste, Harrus *et al.* (1997b) encontraron que los animales de edades medias son más susceptibles. Además Rodríguez-Vivas *et al.* (2004), determinó estadísticamente que los canes mayores a 2 años presentan asociación a padecer la enfermedad. El estado inmune, así como una mayor exposición al vector puede explicar el mayor número de casos en el estudio realizado en Yucatán - México. En el presente trabajo no se encontró dicha asociación, que es respaldada por Mathewman *et al.* (1993).

Así mismo, ocurrió con el sexo, tanto los machos como las hembras presentaron probabilidades similares a padecer la enfermedad. Esto es confirmado por las publicaciones de Neer, (2000) y Ettinger, (1992). Múltiples trabajos han determinado que el Pastor Alemán es más susceptible que otras razas a padecer la enfermedad, manifestando signos hemorrágicos severos (Harrus *et al.*, 1997b; Nyindo *et al.*, 1980). Esta susceptibilidad no fue encontrada en el presente estudio, quizá por diferencias en la patogenicidad del agente ehrlichial presente (variabilidad geográfica), o por cruces de esta raza con otras, haciéndola más resistente a la enfermedad. La diferencia radica principalmente en las vías o caminos

inmunes para la eliminación del agente una vez iniciada la infección, es decir todas las razas tienen la misma probabilidad de sufrir la infección, pero no todos pueden eliminar al agente de manera exitosa.

Las 4 variables que resultaron ser significantes estadísticamente fueron la presencia de trombocitopenia, leucopenia y anemia a nivel hematológico y el antecedente de garrapatas. Respecto a la trombocitopenia, se confirma la detección de la alteración más frecuente y típica de la enfermedad, siendo esto respaldado por múltiples estudios, como el de Rodríguez-Vivas *et al.* (2004), de 29 animales con trombocitopenia, 26 fueron serológicamente positivos a *E. canis*, utilizando la misma prueba comercial trabajada en el presente trabajo, es decir el 89.65 % de los animales trombocitopénicos fueron serológicamente positivos a la enfermedad. Este valor es muy similar al encontrado en el presente estudio, donde se observó que de los 63 casos con trombocitopenia, 57 animales fueron serológicamente positivos a la enfermedad, representando el 90.47% \pm 7.25%. Estos resultados son apoyados por Neer (2000), quien indica que la trombocitopenia se da en el 82% de los casos, según diversos estudios en los Estados Unidos y confirmarían que la trombocitopenia es la alteración hematológica típica encontrada en esta infección. Algunos autores indican que la ausencia de trombocitopenia no descarta la enfermedad (Ettinger, 1992); esto podría explicar el caso de 1 animal que teniendo cuenta plaquetaria normal (200,000 – 500,000 /ul.) mostró positividad a la prueba indirecta de ELISA.

La leucopenia resultó ser significativa en los casos evaluados y esta es una alteración reportada comúnmente en esta enfermedad (Sainz *et al.*, 2000). Del los 45 animales que presentaron leucopenia, 40 fueron positivos a ehrlichiosis canina (88.88 \pm 9.19), reafirmando los hallazgos de múltiples autores respecto a la leucopenia como alteración de la enfermedad (Parnell, 2004; Neer, 2000). Esta baja en los leucocitos refiere principalmente la movilización y destrucción masiva de células en circulación sanguínea, principalmente linfocitos y monocitos, las cuales son las células blanco para la *E. canis*. (Neer, 2000)

La anemia resultó ser significativa estadísticamente, ya que de los 67 animales anémicos de la presente investigación, 55 resultaron positivos ($82.09\% \pm 9.18\%$); este dato es respaldado por Neer, (2000) quien indica que la anemia se presenta en el 82% de los casos con ehrlichiosis canina y esta es ocasionada por supresión en la producción de los glóbulos rojos, desencadenando una anemia arregenerativa (Forrellat y Fernández, 2002; Sainz *et al.*, 2000). La destrucción intravascular de los eritrocitos (hemólisis) por trastornos inmunomediados (Greene, 1997) y la alteración en la disponibilidad del hierro son otras causas de suma importancia para la presentación de anemia.

Cabe resaltar que la baja de las 3 líneas celulares ha mostrado significancia estadística, esto indica que la mayoría de los casos presentaron pancitopenia. Esta alteración es típica de los animales en fases crónicas de ehrlichiosis canina (Sainz *et al.*, 2000). El hallazgo de un gran número de casos con esta alteración no significa que exista una mayor cantidad de casos crónicos en los caninos de nuestro medio, sino que los animales en etapas agudas evidencian signos clínicos inespecíficos (López *et al.*, 1999), siendo difícil el diagnóstico si no se cuenta con la experiencia adecuada. De esta forma los animales evidencian signos severos en las etapas avanzadas de la enfermedad, posterior a una fase subclínica (infección persistente) (Harrus *et al.*, 1999).

La significancia estadística encontrada en el presente trabajo para el antecedente de garrapatas demuestra que el artrópodo (*Rhipicephalus sanguineus*) tiene mucha relación con la presencia de la enfermedad, siendo el único vector reconocido como trasmisor de la enfermedad (Groves *et al.*, 1975).

El $94.87\% \pm 6.92\%$ (37 de 39) de los casos pancitopénicos, fueron animales positivos a ehrlichiosis canina, lo que hace sospechar que estos animales probablemente se encuentren cursando la etapa crónica de la enfermedad (Sainz *et al.*, 2000). Para confirmar el estado crónico se debe realizar una citología medular, para conocer la celularidad de la médula ósea. Esto no fue realizado en el presente estudio, pero podría ser de mucha utilidad para futuros trabajos. El $93.75\% \pm 11.86\%$ de los casos que presentaron trombocitopenia y anemia simultáneamente, resultaron ser positivos a la enfermedad. Esta asociación es la

alteración bicitopénica más común encontrada en los casos positivos del presente estudio. Esto es ampliamente respaldado por Greene (1997) quien indica que son frecuentes las asociaciones bicitopénicas en la ehrlichiosis canina, atribuyéndolas a cuadros agudos principalmente. Los animales únicamente anémicos (9) resultaron ser en un 88.88% +/- 20.54% negativos (8) a la enfermedad, de tal manera que es menos frecuente que animales que presenten esta única alteración, sean positivos a ehrlichiosis canina. Por consiguiente, estos resultados indican que la pancitopenia constituye un hallazgo hematológico de importancia diagnóstica (Parnell, 2004) seguido de la trombocitopenia y anemia (bicitopenia) en la ehrlichiosis canina.

De los 6 animales negativos a la serología que presentaron trombocitopenia, 2 de ellos fueron pancitopénicos y 1 presentó trombocitopenia y anemia. Estas alteraciones son típicas de la enfermedad, de tal manera que los resultados serológicos negativos hacen pensar fuertemente en la idea de que estos animales probablemente sufrieran una infección por otra especie ehrlichial o una variante antigénica de *E. canis*, como fue reportado en Venezuela anteriormente por Pérez *et al.* (1997) y por Felek *et al.* (2003).

Los Pastores alemanes tienen una respuesta celular pobre, por lo tanto no pueden eliminar al agente ehrlichial de manera adecuada (Harrus *et al.*, 1997; Nyindo *et al.*, 1980), manifestándose en ellos cuadros hemorrágicos severos debido al daño ocasionado por la respuesta inmune humoral alterada (Neer, 2000; Greene, 1997), desencadenando lesiones celulares (trombocitopenia y/o anemia) y vasculares inmunomediadas (complejos inmunes) (Tizard, 2002). De esta manera, no se encontró significancia estadística entre los pastores alemanes y las demás razas a padecer la enfermedad. Estos resultados pueden atribuirse al tipo de muestreo de los casos, es decir, los casos llegaron de manera aleatoria cursando tanto fases agudas como crónicas, no realizándose un monitoreo con animales infectados experimentalmente que evalúe las manifestaciones hemorrágicas, ya que éstas se evidencian con mayor frecuencia en la fase crónica de la enfermedad. Además, estos resultados podrían suponer que la susceptibilidad no es frecuente en los Pastores alemanes en nuestro medio, probablemente por variaciones antigénicas en comparación con cepas de otras regiones geográficas (Felek *et al.*, 2003). Esto también depende de otros factores,

tales como cruces de pastores alemanes con otras razas, contacto constante con el agente en el medio habitual creando cierta resistencia, entre otras.

En el presente estudio se determinó que todos los animales de razas nórdicas (Samoyedos y Siberianos) presentaron cuadros hemorrágicos, siendo la epistaxis la alteración más frecuente. Este hallazgo hace sospechar que ambas razas nórdicas tienen serias dificultades para eliminar al agente ehrlichial, quizá por una disfunción en el sistema inmune similar al del Pastor alemán (Harrus *et al.*, 1997b), llegando a presentar con mayor facilidad cuadros hemorrágicos severos (Nyindo *et al.*, 1980). Los niveles plaquetarios de estos perros fueron menores a 100,000 plaquetas/ul., lo que indica que la trombocitopenia es severa debido al agresivo daño intravascular probablemente por mecanismos inmunomediados (Harrus *et al.*, 1996b; Waner *et al.*, 1995). De manera que, por los datos encontrados se propone a estas razas nórdicas como un nuevo grupo para próximas evaluaciones respecto a la capacidad para eliminar el agente y la respuesta inmune en este grupo racial.

Del total de animales con epistaxis y la alteraciones equimóticas, se encontró que el 100% y el 92.30% \pm 14.49% respectivamente fueron animales positivos a la enfermedad. De esta forma se confirma la información obtenida por otros autores (Sainz *et al.*, 2000; López *et al.*, 1999), los cuales mencionan a la epistaxis como la alteración clínica distintiva de la enfermedad, seguida en frecuencia de otras alteraciones hemorrágicas. De los 11 animales que presentaron epistaxis en el presente estudio, el 100% fueron casos positivos a ehrlichiosis canina. Otros signos tales como postración, linfadenomegalia, hemorragias petequiales y pérdida de peso, son hallazgos comunes en los casos positivos a la enfermedad (Neer, 2000). Es probable que los porcentajes altos hallados para este tipo de signología sea debido al mayor número de casos compatibles con ehrlichiosis en fase crónica. Los signos de esta enfermedad son inespecíficos en etapas agudas, pero las evidencias hemorrágicas (epistaxis y equimosis) acercan mucho al diagnóstico clínico de la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Debido al muy buen grado de concordancia (84.67%) entre el examen hematológico y la prueba comercial de ELISA indirecta, se concluye que los animales con signos clínicos compatibles a ehrlichiosis canina, que presenten alteraciones hematológicas típicas de la misma (trombocitopenia y/o anemia) y antecedentes de garrapatas, es muy probable que cursen la enfermedad, por lo tanto es recomendable el inicio de la terapia antibiótica. En caso de no encontrar alteraciones hematológicas evidentes, con la presencia de signos clínicos compatibles y/o antecedentes de garrapatas se recomienda el descarte serológico de anticuerpos contra la enfermedad.
- La trombocitopenia, la leucopenia y la anemia son las alteraciones más frecuentes encontradas en los casos evaluados en el presente trabajo, reconociendo que la *E. canis* desencadena estas alteraciones citopénicas en altos porcentajes. Debido a que en otros países las citopenias se manifiestan en frecuencias diferentes. Éste estudio constituye el primer reporte del impacto de la ehrlichiosis canina sobre las líneas celulares sanguíneas en los casos de nuestro país. Además, el antecedente de garrapatas (*R. sanguineus*) es un dato importante para acercarnos al diagnóstico clínico de la enfermedad.

- La pancitopenia (típicamente reportada en la ehrlichiosis canina crónica) fue la asociación más frecuente en los casos evaluados, seguida de la trombocitopenia y anemia (bicitopenia). Estos datos son de gran importancia diagnóstica a nivel hematológico en nuestro medio para futuros casos de ehrlichiosis canina por *Ehrlichia canis*.
- Los cuadros hemorrágicos son los signos clínicos por excelencia de la ehrlichiosis canina. La epistaxis es la alteración clínica típica de la enfermedad, presentándose únicamente en los casos positivos del presente estudio. A su vez, los cuadros equimóticos son también de gran importancia para el diagnóstico clínico laboratorial.
- Las razas caninas nórdicas (Siberian-Husky y Samoyedo) constituyen un grupo racial importante para próximas investigaciones, debido a que en ellas los cuadros hemorrágicos típicos (epistaxis), así como otros signos clínicos se manifestaron claramente en el presente estudio.
- Finalmente, se recomienda continuar con las investigaciones en el diagnóstico de la ehrlichiosis canina en etapas sintomáticas y asintomáticas, ya que esta enfermedad realiza infección persistente, mecanismo por el cual deja de manifestar signos clínicos, haciéndose “imperceptible” a los ojos del investigador y predisponiendo al animal a la más grave de las etapas de esta infección, que al parecer hemos evaluado en mayores porcentajes en el presente estudio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Adrianzén, J.** 2002. Seroprevalencia de la Dirofilariosis y Ehrlichiosis canina en los distritos de Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores. Tesis Bachiller. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.:68p.
- **Aguirre, E., A. Sainz, S. Dunner, I. Amusatogui, L. López, F. Rodríguez-Franco, I. Luaces, O. Cortés, M. A. Tesouro.** 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. Veterinary Parasitology. 125:365-372.
- **Alleman, A. R., A. F. Barbet, M. V. Bowie, H. L. Sorenson, S. Wong, and M. Bélanger.** 2000. Expression of a gene encoding the major antigenic protein 2 homologue of *Ehrlichia chaffensis* and potential application for serodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology. 38:3705-3709.
- **Alleman, A. R., L. J. McSherry, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, H. L. Sorenson, V. Bowie, and M. Bélanger.** 2001. The recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potential diagnostic tool. Journal of Clinical Microbiology. 39:2494-2499.

- **Anderson, B. E., J. E. Dawson, D. C. Jones, and K. H. Wilson.** 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:2838-2842.
- **Arraga-Alvarado C., O. Parra, M. Palmar, R. E. Chango, and M. C. Alvarado.** 1997. *Ehrlichia platys*: preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. *Revista Científica FCV-LUZ* 7:Suppl 2 99-109.
- **Benjamín, M.** 1991. *Manual de Patología Clínica en Veterinaria*. 3ra ed. México: Limusa.: 61-205p.
- **Beaufils, J. P.** 1997. Ehrlichiosis: Clinical aspects in dogs and cats. *International Forum on Ticks and Tick-Borne Disease, Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 19: 57-61.
- **Botelho de Castro, M., R. Z. Machado, L. P. C. Tomaz de Aquino, A. C. Alessi, and M. T. Costa.** 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis : clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*. 119:73-86.
- **Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, and S. I. Hancock.** 1998. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 42:362-368.
- **Brooks, G. F., Butel, J. S., y Morse, S. A.** 1999. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México. Manual Moderno.: 375-382p.

- **Brouqui, P., M. L. Birg and D. Raoult.** 1994. Cytopathic effect, plaque formation, and lysis of *Ehrlichia chaffeensis* grown on continuous cell lines. *Journal Infection and Immunity*. 62:405-411.
- **Buhles, Jr., W. C. Huxsoll, D. I. Ristic, M.** 1974. Tropical Canine Thrombocytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *Journal of Inf. Disease*. 130, 357-367.
- **Buller, R. S., M. Arens, S. P. Hmiel, C. D. Paddock, J. W. Sumner, Y. Rikihisa, A. Unver, M. Gaudreault-Keener, F. A. Manian, A. M. Liddell, N. Schmulewitz and G. A. Storch.** (1999). *Ehrlichia ewingii*, a Newly Recognized Agent of Human Ehrlichiosis. *New England Journal of Medicine*. 341: 148-155.
- **Carter, G. R.** 1985. *Bacteriología y Micología Veterinarias*. México: El Manual Moderno.: 280-287p.
- **Casadevall, A.** 2003. Antibody-Mediated Immunity against Intracellular Pathogens: Two-Dimensional Thinking Comes Full Circle. *Journal Infection and Immunity*. 71:4225-4228.
- **Chavera, A., Viera, F. y Samamé, H.** 1982. Ehrlichiosis canina en el Perú. *Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias*, Ica - Perú.
- **Codner, E. C., and L. Farris-Smith.** 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 189:47-50.
- **Cohen, J.** 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1:37-46.

- **Collins K., and C. P. Moore.** 1999. Diseases and surgery of the canine anterior uvea. *In: Veterinary Ophthalmology* (ed). Gelatt KN, 3rd ed., pp 755-795, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- **Dagnone, A. S., De Morais, H. S. A., Vidotto, M., Jojima, F. S., Vidotto, O.** 2003. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a Hospital population in South Brazil. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17:422-3.
- **De Morais, H., Hoskins, J., Pereira, N., Labarthe, N.** 2004. Guidelines for diagnosis and management of dogs infected with *Ehrlichia spp.* *Clínica Veterinaria*. 48:28-30.
- **Dumler, J. S., A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa.** 2001. Reorganization of Genera in the Families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*; Unifying of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*; Description of six New Species Combinations; and Designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as Subjective Synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
- **Ettinger, S. J.** 1992. Tratado de Medicina Interna. Enfermedades del perro y del gato. México: Inter.-Médica.: 297-299p.
- **Felek, A., Greene, R. Rikihisa, Y.** 2003. Transcriptional Analysis of p30 Major Membrane Protein Genes of *Ehrlichia canis* in Naturally Infected Ticks and Sequence Analysis of p30-10 of *E. Canis* from Diverse Geographic Regions. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:886-888.

- **Feng, H-M., and D. H. Walker.** 2004. Mechanisms of Immunity to *Ehrlichia muris* : a Model of Monocytotropic Ehrlichiosis. Journal Infection and Immunity. 72:966-971.
- **Forellat, M. y N. Fernández.** 2002. Anemia de los procesos crónicos. Aspectos clínicos y de laboratorio. Revista Cubana de Hematología e Inmunología. 18(3): 234-241.
- **Glaze M. B., and S. D. Gaunt.** 1986. Uveitis associated with *Ehrlichia platys* infection in a dog. Journal of American Veterinary Medicine Association. 188:916-917.
- **Greene, R. T.** 1997. Ehrlichiosis canina: Implicaciones clínicas de factores humorales, p. 317-320. En Kirk (ed.), Terapéutica Veterinaria de Pequeños animales. 12va ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
- **Groves, M. G., G. L. Dennis, H. L. Amyx and D. L. Huxsoll.** 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). American Journal Veterinary Research. 36:937-940.
- **Gusa, A. A., R. S. Buller, G. A. Storch, M. M. Huycke, L. J. Machado, L. N. Slater, S. L. Stockman, and R. F. Massung.** 2001. Identification of a p28 Gene in *Ehrlichia ewingii*: Evaluation of Gene for Use as a Target for Species-Specific PCR Diagnostic Assay. Journal of Clinical Microbiology. 39:3871-3876.
- **Harrus, S., T. Waner, D. J. Weiss, A. Keysary, and H. Bark.** 1996a. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 51:13-20.

- **Harrus, S., T. Waner, A. Eldor, E. Zwang, and H. Bark.** 1996b. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Rec.* 139:290-293.
- **Harrus, S., T. Waner, Y. Avidar, E. Bogin, P. Huo-Cheng, and H. Bark.** 1996c. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology.* 66:241-249.
- **Harrus, S., T. Waner, and H. Bark.** 1997a. Canine monocytic ehrlichiosis an update. *Comp. Cont. Ed. Prac. Vet.* 19:431-444.
- **Harrus, S., Kass, P. H., Klement, E. and Waner, T.** 1997b. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.* 141:360-363.
- **Harrus, S., T. Waner, I. Aizenberg, J. E. Foley, A. M. Poland, and H. Bark.** 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 36:73-76.
- **Harrus, S., T. Waner, H. Bark, F. Jongejan and A. W. C. A. Cornelissen.** 1999. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 71:2516-252.
- **Harvey J. W., C. F. Simpson, J. M. Gaskin.** 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *Journal of Infec. Dis.* 137:182-188.
- **Harvey J. W.** 1993. Infección por *Ehrlichia platys* (trombocitopenia cíclica infecciosa en perros y gatos). *In: Enfermedades infecciosas de perros y gatos*, (ed) C. E. Greene., pp 435-439, Interamericana McGraw-Hill, México.

- **Hatch, T. P., I. Allan, and J. H. Pearce.** 1984. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia spp.* Journal of Bacteriology. 157:13-20.
- **Hegarty, B. C., M. G. Levy, R. F. Gager, and E. B. Breitschwerdt.** 1997. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 9:32-38.
- **Hibler, S. C., J. D. Hoskins and C. E. Greene.** 1986. Rickettsial infections in dogs. Part II. Ehrlichiosis and Infection Cyclic Thrombocytopenia. Comp. Cont. Ed. 106:Suppl 8 106-114.
- **Hildebrandt, P. K., D. L. Huxsoll, J. S. Walker, R. M. Nims, R. Taylor, and M. Andrews.** 1973. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). Am. J. Vet. Res. 34:1309-1320.
- **Hoskins, J. D., O. Barta, and J. Rothschnitt.** 1983. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183:1011-1012.
- **Iqbal, Z., W. Chaichanasiriwithaya, and Y. Rikihisa.** 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology. 32:1658-1662.
- **Johnson, E. M., S. A. Ewing, R. W. Barker, J. C. Fox, D. W. Crow, and K. Kocan.** 1998. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 74:277-288.
- **Kakoma, I., C. A. Carson, M. Ristic, E. M. Stephenson, P. K. Hildebrandt, and D. L. Huxsoll.** 1978. Platelet migration inhibition as an indicator of

immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. *Infection and Immunity*. 20:242-247.

- **Knowles, T. T., A. R. Alleman, H. L. Sorenson, D. C. Marciano, E. B. Breitschwerdt, S. Harrus, A. F. Barbet, and Myriam Bélanger.** 2003. Characterization of the Major Antigenic Protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and Its Application for Serodiagnosis of Ehrlichiosis. *J. Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10:520-524.
- **Kordick, S. K., E. B. Breitschwerdt, B. C. Hegarty, K. L. Southwick, C. M. Colitz, S. I. Hancock, J. M. Bradley, R. Rumbough, J. T. Mepherson, and J. N. MacCormack.** 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:8 2631-2638.
- **Laboratorios IDEXX.** 2002. Kit canino para la prueba de antígenos de *Dirofilaria immitis* y anticuerpos de *Borrelia burgdorferi* y de *Ehrlichia canis*.
- **Lewis, D. C., and K. M. Meyers.** 1996. Canine idiopathic thrombocytopenia purpura. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 10:207-218.
- **Lockwood, C. M.** 1983. Immunological functions of the spleen. *Clinic Hematology*. 12:449-465.
- **López, J. D., M. Rivera, J. C. Concha, S. Gatica, M. Loeffelholz and O. Barriga.** 2003. Serologic evidence for human Ehrlichiosis in Chile. *Rev. Med. Chile*. 131: 67-70.
- **López, J., A. Castillo, M. Muñoz y S. Hildebrant.** 1999. Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. *Arch. Med. vet*. 31: 211-214.

- **Lovering, S. L., K. R. Pierce, and L. G. Adams.** 1980. Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis. *American Journal of Veterinary Research.* 41:1266-1271.
- **Martin C. L., y J. Stiles.** 1998. Ocular infections. *In: Infectious Diseases of the Dog and Cat.* (ed) C. E. Greene. 2nd ed., pp 658-672, WB Saunders, Philadelphia, PA.
- **Matthewman, L. A., P. J. Kelly, S. M. Mahan, D. Semu, M. Tagwira, P. A. Bobade, P. Brouqui, P. R. Mason, and D. Raoult.** 1993. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 64:111-115.
- **McBride, J. W., X. Yu, and D. H. Walker.** 1999. Molecular Cloning of the Gene for a Conserved Major Immunoreactive 28-Kilodalton Protein of *Ehrlichia canis*: a Potencial Serodiagnostic Antigen. *Journal of Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 6:392-399.
- **McBride, J. W., X. Yu, and D. H. Walker.** 2000. A conserved, transcriptionally active *p28* multigene locus of *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 6:392-399.
- **McBride, J. W., R. E. Corstvet, E. B. Breitschwerdt, and D. H. Walker.** 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *Journal of Clinical Microbiology.* 39:315-322.
- **McBride, J. W., L. M. Ndip, V. L. Popov, and D. H. Walker.** 2002. Identification and Functional Analysis of an Immunoreactive *DsbA*-Like Thio-Disulfide Oxidoreductase of *Ehrlichia spp.* *Journal Infection and Immunity.* 70:2700-2703.

- **McBride, J. W., R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, C. Boudreaux, T. Guedry and D. H. Walker.** 2003. Kinetics of Antibody Response to *Ehrlichia canis* Immunoreactive Proteins. *Journal of Infection and Immunity*. 71:2516-2524.
- **Neer, T. M.** 2000. Ehrlichiosis monocítica y granulocítica canina, p. 153-163. *En* C. E. Greene (ed.), *Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. McGraw-Hill Interamericana. México.
- **Nyindo, M., D. L. Huxsoll, M. Ristic, I. Kakoma, J. L. Brown, C. A. Carson, and E. H. Stephenson.** 1980. Cell-mediated and humoral immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.* 41:250-254.
- **Nyindo, M., I. Kakoma, and R. Hansen.** 1991. Antigenic analysis of four species of the genus *Ehrlichia* by use of protein immunoblot. *Am. J. Vet. Res.* 52:1225-1230.
- **Ohashi, N., A. Unver, N. Zhi, and Y. Rikihisa.** 1998a. Cloning and expression of immunodominant 30-kDa major outer membrane protein of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:2671-2680.
- **Ohashi, N., N. Zhi, Y. Zhang, and Y. Rikihisa.** 1998b. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Journal of Infection and Immunity*. 66:132-139.
- **Ohashi, N., Y. Rikihisa, and A. Unver.** 2001. Analysis of Transcriptionally Active Gene Clusters of Major Outer Membrane Protein Multigene Family in *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis*. *Journal Infection and Immunity*. 69:2083-2091.

- **Olano, J. P., W. Gary, H. Feng, J. W. McBride, and D. H. Walker.** Histologic, Serologic, and Molecular Analysis of Persistent Ehrlichiosis in a Murine Model. *American Journal of Pathology*. 165:997-1006.
- **Paddock, C. D. and Childs, J. E.** 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a Prototypical Emerging Pathogen. *Clinical Microbiology Review*. 16:37-64.
- **Page, R. L.** 1995. Clinical implication of lymphocyte phenotyping. In: *Proceedings of the North American Veterinary Conference*. 9:257.
- **Pal, U., R. R. Montgomery, D. Lusitani, P. Voet, V. Ewynants, S. E. Malawista, Y. Lobet, and E. Fikrig.** 2001. Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. *Journal of Immunology*. 166:7398-7403.
- **Panciera R. J., S. A. Ewing, and A. W. Confer.** 2001. Ocular Histopathology of Ehrlichial Infections in the Dogs. *Veterinary Pathology*. 38:43-46.
- **Parnell, N.** 2004. Ehrlichiosis canina, p. 1122-1124. En R. V. Morgan (ed.), *Clínica de pequeños animales*. El Sevier. España.
- **Pérez, M., Y. Perazzo, Y. Perera and M. Bodor.** 1997. Experimental *Ehrlichia canis* infection in MA-50 mice. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 2:47-70.
- **Perille, A. L., y R. E. Maltus.** 1991. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 5:195-198.
- **Pierce, K. R., G. E. Marrs, and D. Hightower.** 1977. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. *Am. J. Vet. Res.* 38:1821-1825.

- **Popov, V.L., V. C. Han, S. M. Chen, J. S. Dumler, H. M. Feng, T. G. Andreadis, R. B. Tesh, and D. H. Walker.** 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J. Med. Microbiol. 47:235-251.
- **Prescott, L., J. Harley and D. Klein.** 1999. Microbiología. España. 4a Ed. McGraw-Hill Interamericana. 475-6p.
- **Reardon, M. J., y K. R. Pierce.** 1981a. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. Veterinary Pathology. 18:48-61.
- **Reardon, M. J., y K. R. Pierce.** 1981b. Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems of selectively immunosuppressed dogs. Veterinary Pathology. 18:384-395.
- **Rikihisa, Y., S. A. Ewing, J. C. Fox, A. G. Siregar, F. H. Pasariba, and M. B. Malole.** 1992. Analysis of *Ehrlichia canis* and canine granulocytic *Ehrlichia* infection. Journal of Clinical Microbiology. 30:143-148.
- **Rikihisa, Y., S. Yamamoto, I. Kwak, Z. Iqbal, G. Kociba, J. Mott, and W.Chichanasiriwithaya.** 1994a. C-reactive protein and 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. Journal of Clinical Microbiology. 32:912-917
- **Rikihisa, Y., S. A. Edwing, and J. C. Fox.** 1994b. Western immunoblot analysis of *E. chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. Journal of Clinical Microbiology. 32:2107-2112.
- **Rikihisa, Y.** 1996. Ehrlichiae. In “*Rickettsiae and Rickettsial Diseases*”, Proceedings of the Vth International Symposium. Stara Lesna, Sept. 1-6, 1996.

- **Ristic, M., y C. J. Holland.** 1993. Canine ehrlichiosis, p. 169-186. *In* Z. Woldehiwet, and M. Ristic (ed.), Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- **Rodriguez-Vivas, R. I., R. E. F. Albornoz, G. M. E. Bolio.** 2004. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatán, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. Veterinary Parasitology. In press.
- **Roitt, D., y P. Delves.** 2003. Inmunología. 10a ed. Argentina: Médica Panamericana.: 183-248p.
- **Sainz, A., I. Amusatogui, F. Rodríguez y M. A. Tesouro.** 2000. Las ehrlichiosis en el perro: presente y futuro.
http://wcolvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm
- **Schwan, T., J. Piesman, W. T. Golde, M. C. Dolan, and P. A. Rosa.** 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:2909-2913.
- **Shu-yi Li, J., y G. M. Winslow.** 2003. Survival, Replication, and Antibody Susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of Host Cells. Journal Infection and Immunity. 71:4229-4237.
- **Smith, R. D., M. Ristic, D. L. Huxsoll, and R. A. Baylor.** 1975. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. Journal Infection and Immunity. 11:1216-1221.
- **Swanson J. F., y Dubielzig R. R.** 1996. Clinical and histopathological characteristics of acute canine ocular ehrlichiosis. Trans A. Meet. Am. Coll. Vet. Ophthalmol. 17:219-232.

- **Thibaut, J.** 1989. Intoxicación por estrógenos en un perro. Arch. Med. Vet. 2: 159-162.
- **Tizard, I.** 2002. Inmunología Veterinaria. 5ta ed. México: McGraw – Hill Interamericana.: 233 - 253p.
- **Unver, A., M. Perez, N. Orellana, H. Huang, and Y. Rikihisa.** 2001. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. Journal of Clinical Microbiology. 39:2788-2793
- **Unver, A., N. Ohashi, T. Tajima, R. W. Stich, D. Grover, and Y. Rikihisa.** 2003. Transcriptional Analysis of p30 Major Outer Membrane Multigene Family of *Ehrlichia canis* in Dogs, Ticks, and Cell Culture at Different Temperatures. Journal Infection and Immunity. 69:6172-6178.
- **Vadillo, S., S. Píriz y E. Mateos.** 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. México. p853.
- **Vidotto, M. C., T. C. McGuire, T. F. McElwain, G. H. Palmer, and D. P. Knowles, Jr.** 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. Journal Infection and Immunity. 62:2940-2946.
- **Waner, T., S. Harrus, D. J. Weiss, H. Bark, and A. Keysary.** 1995. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 48:177-182.
- **Weiser, M. G., M. A. Thrall, R. Fulton, E. R. Beck, L. A. Wise, J. L. Van Steenhouse.** 1991. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 7, 84–88.

- **Winslow, G. M., E. Yager, K. Shilo, E. Volk, A. Reilly, and F. K. Chu.** 2000. Antibody-Mediated Elimination of the obligate Intracellular Bacterial Pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during Active Infection. *Journal Infection and Immunity*. 68:287-2195.
- **Wong, S. J., and J. A. Thomas.** 1998. Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:1959-1963.
- **Woody, B. J., y J. D. Hoskins.** 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 21:75-98.
- **Yu X. L., X. F. Zhang, J. W. Mc. Bride, Y. Zhang and D. H. Walker.** 2001. Phylogenetic relationship of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia platys* to other Ehrlichia species determined by *GroEL* aminoacid sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1143-1146.
- **Yu, X-J., J. W. McBride, X.-F. Zhang, and D. H. Walker.** 2000. Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. *Gene* 248:59-68.
- **Zavala C., J., A. Ruiz, J. Zavala V.** 2004. Las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas: Respuesta inmune y sus proteínas inmunodominantes. *Rev Med. Chile*. 132:381-387.